

## DESARROLLO DE UN PROCESO TECNOLÓGICO PARA EL MEJORAMIENTO DE LA DIGESTIBILIDAD DE PRODUCTOS LÁCTEOS POR $\beta$ -GALACTOSIDASA INMOVILIZADA

J. Woolkott-Hurtado\*, G. Gamarra-Ballena\*\*

\*Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química  
Av. Venezuela s/n Lima - Perú

\*\*Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Jr. Puno 1002, Lima - Perú

**Summary :** Five strains of *Kluyveromyces marxianus* and one of *Candida pseudotropicalis* were cultured in medium M-I for production of  $\beta$ -galactosidase (E.C: 3:2:1:23). The strain *Kluyveromyces marxianus* NRRL- Y - 1109 was selected for the best production of enzyme and the maximum yield of enzyme was obtained on 5% of lactose supplemented with 0.5% yeast extract, 0.75%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 0.45%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (w/v). It obtained a yield of 5.43 U/mg of protein and 1.31 A.U<sub>ONPG</sub>/mg of dry weight. The extraction of the enzyme from viable cells was performed by toluene 2% (v/v), during 15 hours of treatment at 30°C, in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0  $\pm$  0.1, supplemented with 1 mM magnesium and 0.1 mM manganese sulfate. The yield of immobilization of enzyme on chitin treated with glutaraldehyde was 41%, being the optimum pH of 6.6  $\pm$  0.1. The values of  $K_m$  and  $V_m$  for immobilized using lactose as substrate were 49 mM and 161 micromole/mim/g of support respectively. The  $K_i$  by galactose was 44 mM. The half-life of immobilized enzyme at 40°C was 176 min, maintaining 99% of activity for 3 months at 4°C and retained 64% of original activity even after being used for 20 times.

**Key words:** Enzyme, Lactase.  $\beta$ -Galactosidase

**Resumen :** Cinco cepas de levadura de *Kluyveromyces marxianus* y una cepa de *Candida pseudotropicalis* fueron cultivadas en medio M -I, para la producción de  $\beta$ -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23). La cepa *Kluyveromyces marxianus* NRRL- Y - 1109 fue seleccionada por obtenerse mayor producción de la enzima y el máximo rendimiento de la enzima se obtuvo con 5% de lactosa suplementado con extracto de levadura 0.5%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.75% y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.45% (p/v), obteniéndose un rendimiento de 5.43 U/mg de proteína y 1.31 U.A<sub>ONPG</sub>/mg de peso seco. La extracción de la enzima a partir de células viables se realizó con tolueno 2% (v/v), durante 15 horas de tratamiento, a 30°C, en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0  $\pm$  0.1, suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso. El rendimiento de inmovilización de la enzima sobre quitina tratada con glutaraldéhidro fue de 41%, siendo el pH óptimo de 6.6  $\pm$  0.1. Los valores de  $K_m$  y  $V_m$  para la enzima inmovilizada utilizando lactosa como substrato fueron 49 mM y 161 micromoles/mim/g de soporte. El  $K_i$  para galactosa fue de 44 mM. La vida media a 40°C de la enzima inmovilizada fue de 176 min, manteniendo 99% de su actividad durante 3 meses a 4°C y reteniendo hasta el 64% de su actividad original aún después de ser usada 20 veces.

**Palabras clave:** Enzima, Lactasa.  $\beta$ -Galactosidasa

### INTRODUCCION

Una de las aplicaciones más promisorias para el tratamiento en la industria láctica es la aplicación de la tecnología enzimática para la reducción del

contenido de lactosa en leche y subproductos lácteos. Esta acción es realizada mediante una hidrólisis enzimática utilizando la  $\beta$ -D-galactosido galactohidrolasa (E.C. 3.2.1.23), la cual transforma la lactosa en galactosa y

\* E-mail : d160098@unmsm.edu.pe



glucosa teniendo este último más poder edulcorante que la lactosa(4). Esta transformación enzimática mejora los problemas de insolubilidad y de baja dulzura del producto. Este tratamiento hace, a la leche un alimento más nutritivo y aprovechable (31). La hidrólisis enzimática de la lactosa en suero lácteo permite la recuperación de los subproductos de la industria láctea y disminuir los niveles de contaminación (17).

Las levaduras lactosa fermentativas, tales como *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* y *Candida pseudotropicalis* y los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, son las principales fuentes de enzima y las más usadas comúnmente para su preparación (37).

En la actualidad la hidrólisis enzimática es realizada con enzima soluble; pero presenta el inconveniente de no poder ser recuperada. De ahí que la inmovilización de la enzima es una buena alternativa, presentando la ventaja de poder ser reutilizadas permitiendo abaratar los costos de producción y separación.

La quitina posee buenas propiedades mecánicas, elevada estabilidad química y biológica y una adecuada reactividad hacia agentes bifuncionales (19).

Lactasa de *Kluyveromyces fragilis*, (sinónimo de *Kluyveromyces marxianus*) y *Aspergillus oryzae* han sido inmovilizada en quitina tratada con glutaraldéhidro por (19, 20, 21, 22, 23, 24). Lactasa de *Kluyveromyces marxianus* ha sido inmovilizada en quitosano (7), en soporte magnético no poroso (16), en moyuelo de maíz (14).

El presente estudio tuvo como propósito determinar las condiciones operativas óptimas para la producción y extracción de  $\beta$ -galactosidasa a partir de cinco cepas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109, 1207, 1151, 1175 y 1196 y una cepa de *Candida pseudotropicalis* NRRL-Y-329, en medios químicamente formulados. Establecer las bases para el diseño de un proceso tecnológico para inmovilizar la enzima. Determinar el perfil térmico, pH óptimo, constantes cinéticas, vida media y determinar su capacidad de hidrolizar la lactosa presente en leche y suero lácteo.

## MATERIALES Y METODOS

**Microorganismos y medio de mantenimiento.** Se utilizaron 6 cepas de levaduras con capacidad de utilizar lactosa como fuente de carbono: 5 cepas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109, 1175, 1151, 1207, 1196 y una cepa de *Candida pseudotropicalis* NRRL-Y-329, procedentes de la Northern Regional Research Laboratory (NRRL), pertenecientes a la colección de levaduras del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Las levaduras fueron mantenidas sobre Agar Y.P.L (29) con la siguiente composición: Lactosa 1%; Peptona de Caseína 1%; Extracto de levadura 0.3% y Agar 1.5% (Sigma y Merck), y conservados a 4°C, transferidos mensualmente y verificados en su pureza.

**Selección de cepas de levaduras con potencial de producción de  $\beta$ -galactosidasa.** Los inóculos fueron preparados en matraces de 500 ml con 50 ml de caldo Y.P.L con la siguiente composición: Lactosa 2%; Extracto de levadura 0.3%, Peptona de caseína 1%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5% y  $\text{MgSO}_4$  0.05%. a pH 5.5 e incubados a 30°C por 15 horas. Matraces de un litro con 90 ml de caldo Y.P.L fueron inóculados con 10% (v/v) del caldo Y.P.L e incubados a 30°C con agitación constante (150 strokes/minuto). La pureza de los inóculos se verificó por microscopía.

La actividad hidrolítica de la lactasa de las levaduras fue determinada en medio M-I (13); con la siguiente composición: Lactosa 5%; Extracto de levadura 0.75%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.84%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.45% y  $\text{MgSO}_4$  0.05%. Matraces de un litro con 90 ml del medio M-I, a pH 5.5 fueron inóculados con 10% (v/v) del caldo Y.P.L e incubados a 30°C por 12 horas con agitación constante (150 strokes/minuto).

**Extracción de la enzima.** Para la extracción de la enzima se siguió el procedimiento descrito por Mahoney y Fenton (27, 11). Células frescas de un cultivo fueron centrifugadas a 20,000 rpm por 20 minutos en una centrifuga



refrigerada MIKRO RAPID a 4°C. Las células lavadas fueron tratadas con 1 a 3% de tolueno (Sigma) (v/v) bajo agitación por 90 minutos a 30°C. La extracción de la enzima se realizó en tampón fosfato de potasio a concentraciones de 0.001 M a 1 M, a pH 6.0-8.0 suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso. El tiempo de extracción fue de 15 a 20 horas, a temperaturas de 22 a 37°C. Las células fueron removidas por centrifugación y parcialmente purificada con acetona a 4°C (v/v).

**Inmovilización de la enzima.** Para la inmovilización de la enzima sobre quitina se siguió el procedimiento diseñado por Illanés y col. (18, 21), que comprende dos etapas. En la primera, la quitina (Sigma) es tratada con ácido acético 5% (v/v) por 30 minutos a 50°C y activada con glutaraldéhidó al 25% (Sigma), dejándose reposar por 16 horas a pH 4.5 y temperatura ambiente. En la segunda el soporte activado es contactado con las diferentes concentraciones de enzima, en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 8.5, dejándose reposar en refrigeración por 20 horas. Se lavó con tampón fosfato de potasio 0.1 M diluido 1/10, pH 6.6. La enzima se almacenó en refrigeración en una solución 1 mM de ditioeritritol (Sigma) preparado en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.6 suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso hasta su uso.

**Determinación del rendimiento de inmovilización y capacidad de carga.** Para la determinación del rendimiento de inmovilización y capacidad de carga se trabajó con concentraciones de la enzima: entre 110 a 880 Unidades por gramo de quitina. Se define el rendimiento de inmovilización como el porcentaje de la actividad original contactada que es expresada en el catalizador sólido y la capacidad de carga como la actividad específica cargada por unidad de peso seco de soporte.

**Propiedades de la enzima soluble e inmovilizada.** El pH óptimo y temperatura para la actividad de la enzima soluble e inmovilizada fueron determinados,

midiendo la actividad específica en un rango de pH de 5.8 - 8.0 a 40°C y para la temperatura un rango de 25 a 65°C, usando lactosa preparada en tampón fosfato de potasio 0.1M, pH 6.6.

La estabilidad de la enzima a la temperatura se determinó a 40°C para la enzima soluble y 25, 30 y 40°C para la enzima inmovilizada. Para los ensayos respectivos se mantuvo las muestras de enzima a las temperaturas escogidas en tampón fosfato de potasio. En el caso de la enzima soluble por 4 horas y por 12 horas la enzima inmovilizada extrayendo muestras para los ensayos correspondientes La actividad residual de la enzima sobre lactosa fue medida como función del tiempo y usada para calcular la vida media de la enzima.

La estabilidad de la enzima inmovilizada a 4°C en una solución de tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.6, complementado y ditioeritritol 1mM como estabilizador fue determinada, tomándose muestras para los análisis respectivos en un periodo de 90 días.

**Parámetros cinéticos.** Los valores de  $K_m$  y  $V_m$  para concentraciones de lactosa entre 5 - 100 mM y 14.6 - 292 mM, para la enzima soluble e inmovilizada fueron determinados por el método de Lineweaver-Burk.

Para la constante de inhibición  $K_i$  se utilizaron las mismas concentraciones utilizadas para la determinación de  $V_m$  y  $K_m$  adicionándole a cada concentración galactosa 27.7 mM y 75, 100, 150 y 200 mM. para la enzima soluble e inmovilizada respectivamente.

**Determinación de la actividad enzimática.** La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente en un espectrofotómetro SPECTRONIC 20D MILTON ROY, siguiendo el procedimiento descrito por Mahoney y col. (27), utilizando como sustrato 1.25 mM de O-Nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.6 suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso. Tampón que se utilizará en todas las determinaciones de actividad enzimática. La mezcla de reacción



contenía 2 ml de ONPG y 0.1 ml del extracto enzimático (dilución apropiada), luego se incubó a 40°C durante 2 minutos, la reacción fue detenida con 0.9 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 M y se leyó a 420 nm comparándose los resultados con una curva estándar de O-Nitrofenol (Sigma).

La actividad de la enzima también fue determinada con lactosa (Sigma), a concentraciones de 20 y 200 g/l en tampón fosfato de potasio para la enzima soluble e inmovilizada respectivamente. La mezcla de reacción contenía 2 ml de la solución de lactosa y 0.1 ml de la enzima soluble y cantidades de enzima inmovilizada entre 0.001 y 0.005 g, luego se incubó durante 2 minutos a 40°C, bajo agitación suave en el caso de la enzima inmovilizada, y la reacción fue detenida con 0.9 ml de carbonato de sodio 0.5M.

La glucosa liberada fue determinada por el método de la glucosa oxidasa (Sigma). En el caso de la enzima inmovilizada se determinó por secado en la estufa MEMMERT S 30 toda la noche a 60°C, la cantidad de enzima inmovilizada contactada con el sustrato. La unidad de actividad de β-galactosidasa es definida como la cantidad de enzima que libera un micromol de O-Nitrofenol o glucosa por minuto por miligramo de proteína o por gramo de soporte en la enzima inmovilizada. La actividad de la enzima inmovilizada también fue determinada con leche entera en polvo reconstituida a una concentración de 130 g/l (130.26 mM de lactosa). La leche descremada se preparó de la leche reconstituida entera por centrifugación a 10,000 rpm por 20 minutos a 4°C extrayéndose la grasa. El suero lácteo fue preparado a partir de la leche descremada por acidificación con HCl 0.1 N y removida la caseína por centrifugación. La solución de lactosa se preparó a una concentración de 4.5% en tampón fosfato de potasio. Las muestras contenían 25 ml de leche entera y descremada, suero lácteo y lactosa ensayo y cantidades de enzima entre 0.02 a 0.024 g, muestras de cada ensayo fueron extraídas a intervalos de 10 minutos para el análisis de la glucosa liberada.

**Reutilización de la enzima inmovilizada.** La estabilidad de la enzima inmovilizada en

repetidos usos fue examinado midiendo la actividad de la hidrólisis de lactosa en leche. Se preparó leche entera en polvo 130 g/l (4.5 - 4.9% p/v de lactosa), se ajustó el pH a 6.6. Muestras de 25 ml y cantidades entre 0.023 a 0.025 g de la enzima inmovilizada e incubadas por una hora a 40°C con agitación. Al final de la reacción, la enzima era recuperada y lavada en tampón fosfato de potasio, bajo agitación por 15 minutos y utilizada en otro ensayo, sino era mantenida en refrigeración en tampón fosfato y ditioeritritol 1 mM.

**Análisis.** El peso seco de las levaduras fue determinado gravimétricamente para lo cual se extrajeron muestras del cultivo de 5 ml las cuales fueron centrifugadas a 10,000 r.p.m. por 20 minutos a 4°C y lavadas dos veces con agua destilada y transferidas a placas petri de 10X75 mm previamente pesadas, dejadas secar toda la noche en la estufa a 100°C MEMMERT S 30 y pesados en una balanza analítica SARTORIUS.

La lactosa se determinó de acuerdo al método de Miller (30) empleando el ácido 3,5 Dinitrosalicílico (Sigma).

La proteína fue determinada por el método de Lowry (26) empleando el reactivo Folin-Ciocalteu y seroalbúmina de bovino 0.1 mg/ml (Sigma) como estándar.

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Selección de las cepas de levaduras con potencial de producción de β-galactosidasa.** Los resultados de la actividad específica y de unidades de actividad por miligramo de peso seco de las levaduras productoras de β-galactosidasa en lactosa y ONPG como sustratos son mostrados en la **Tabla 1.** La levadura *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109, maximiza la respuesta, en relación a la actividad específica y a las unidades de actividad por miligramo de peso seco. Siendo estos valores de 14.5 U/mg de proteína y de 3.5 Unidades de actividad por mg de peso seco para



TABLA 1. SELECCION DE CEPAS PRODUCTORAS DE  $\beta$ -GALACTOSIDASA EN MEDIO M-I

Cepas	Actividad Enzimática sobre ONPG como sustrato			Actividad Enzimática sobre Lactosa como sustrato		
	Proteína mg/ml	Actividad Especifica U/mg proteína	Unidades de actividad/ mg peso seco	Proteína mg/l	Actividad Especifica U/mg proteína	Unidades de Actividad/ mg peso seco
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-1109	2.15	14.50	3.50	2.15	5.43	1.31
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-1151	1.91	3.58	2.92	1.91	5.07	1.09
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-1196	1.99	12.8	3.23	1.99	4.80	1.22
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-1175	1.91	12.2	2.53	1.91	4.53	0.94
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-1207	1.97	12.02	3.05	1.97	4.44	1.13
<i>Candida pseudotropicalis</i> NRRL-Y-329	1.84	11.00	2.68	1.84	4.05	0.99

lactosa y de 5.43 U/mg de proteína y de 1.31 Unidades de actividad/mg de peso seco para ONPG, en contraste con los valores obtenidos por Mahoney y Witaker (28) de 8.39 U/mg proteína y 3.29 U.A/mg peso seco y 3.11 U/ mg proteína y 1.22 U.A/mg peso seco para lactosa y ONPG respectivamente.

**Extracción de la enzima.-** Los resultados se muestran en la Tabla 2. Las condiciones óptimas fueron obtenidos cuando se empleo 2% de tolueno, tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0, suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso, 30°C de temperatura y 15 horas de extracción. Tiempos de 21 y 17 horas bajo condiciones similares han sido reportados para *Kluyveromyces Marxianus* (11, 27). La purificación parcial de la enzima se realizó con acetona obteniéndose una actividad específica de 73 U/mg de proteína y un rendimiento de purificación de 93%. Valores de 89 y 97% son reportados (15, 28).

**Rendimiento de inmovilización y actividad específica.** Los resultados para el rendimiento de inmovilización y actividad

específica se muestran en la figura 1 y corresponden a aquellos obtenidos a la razón óptima glutaraldehído / quitina de 0.4 g al 25% obtenida en la etapa de activación y muestran el efecto de la enzima contactada/quitina en el rendimiento de inmovilización y la actividad específica del catalizador obtenido, estos valores alcanzan su punto de equilibrio entre los valores de 220 a 440 unidades por gramo de quitina. La mayor carga proteica no incrementa el rendimiento, lo cual podría deberse a una sobresaturación de la enzima en el catalizador, y la actividad en éste no pueda expresarse adecuadamente (18). Los valores hallados fueron de 179 U/g soporte de actividad específica y 41% de rendimiento. Este rendimiento es mayor al 15 y 36% para lactasa de *Kluyveromyces marxianus* y al 36% para lactasas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* reportados (18,19, 20, 22, 23).

**Propiedades de la enzima soluble e inmovilizada.** Los resultados de los análisis del perfil de pH a la temperatura de 40°C son mostrados en la figura 2. La máxima actividad específica de 68 U/mg

FIG. 1 RENDIMIENTO DE INMOVILIZACION Y ACTIVIDAD ESPECIFICA

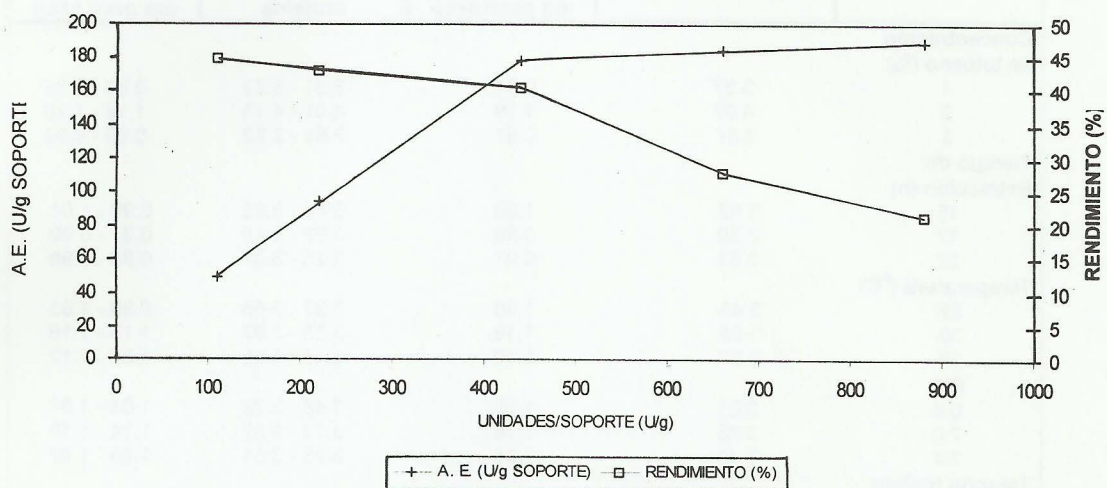


FIG. 2 PERFIL DE pH

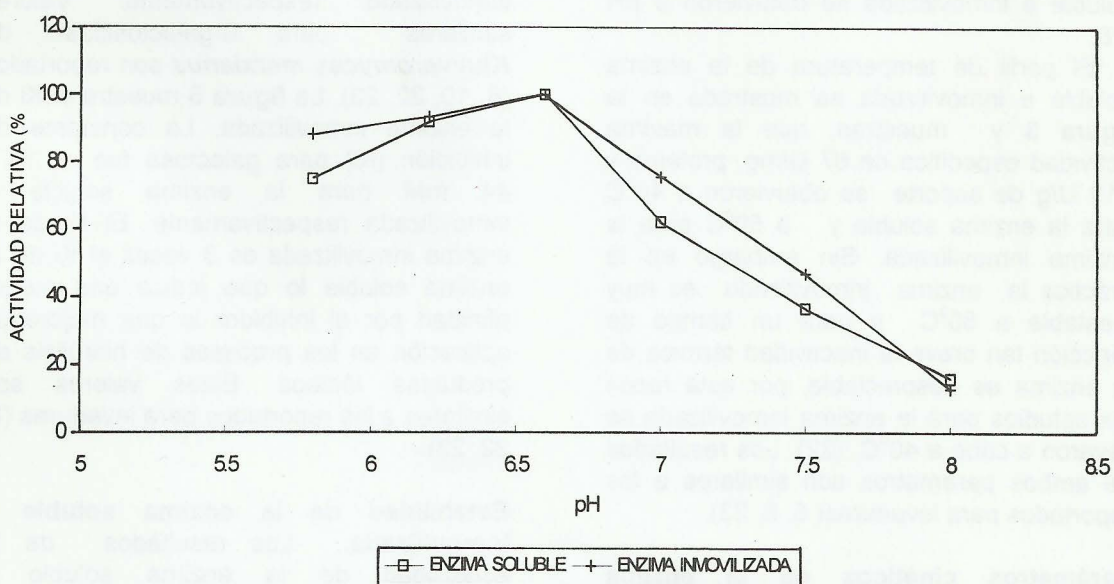




TABLA 2. CONDICIONES OPTIMAS PARA LA EXTRACCION DE  $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109.

Factores	Promedio		Intervalo de confianza 99%	
	Actividad especifica U/mg proteína	Unidades de Actividad <sub>ONPG</sub> /mg peso seco	Actividad especifica U/mg proteína	Unidades de Actividad <sub>ONPG</sub> /mg peso seco
<b>Concentración de tolueno (%)</b>				
1	3.37	0.84	3.31 - 3.43	0.83 - 0.86
2	4.07	1.19	4.01 - 4.13	1.18 - 1.20
3	2.87	0.91	2.81 - 2.92	0.90 - 0.92
<b>Tiempo de Extracción (h)</b>				
15	3.62	1.00	3.56 - 3.68	0.99 - 1.01
17	3.39	0.98	3.33 - 3.45	0.97 - 0.99
20	3.31	0.97	3.25 - 3.37	0.96 - 0.98
<b>Temperatura (°C)</b>				
22	3.43	1.00	3.32 - 3.55	0.99 - 1.03
30	3.85	1.16	3.73 - 3.97	1.13 - 1.18
37	3.57	1.10	3.45 - 3.69	1.07 - 1.12
<b>PH</b>				
6.6	3.61	1.05	3.48 - 3.72	1.03 - 1.07
7.0	3.85	1.16	3.73 - 3.97	1.14 - 1.19
7.4	3.40	1.05	3.28 - 3.51	1.03 - 1.07
<b>Tampón fosfato de potasio (M)</b>				
0.001	3.54	0.97	3.42 - 3.66	0.94 - 0.99
0.1	3.93	1.20	3.81 - 4.05	1.18 - 1.23
1	3.38	1.09	3.26 - 3.50	1.07 - 1.12

proteína y 177 U/g soporte para la enzima soluble e inmovilizada se obtuvieron a pH 6.6.

El perfil de temperatura de la enzima soluble e inmovilizada es mostrada en la figura 3 y muestran, que la máxima actividad especifica de 67 U/mg. proteína y 219 U/g de soporte se obtuvieron a 40°C para la enzima soluble y a 50°C para la enzima inmovilizada. Sin embargo en la práctica la enzima inmovilizada es muy inestable a 50°C y para un tiempo de reacción tan breve la inactividad térmica de la enzima es despreciable, por esta razón los estudios para la enzima inmovilizada se llevaron a cabo a 40°C. (22). Los resultados de ambos parámetros son similares a los reportados para levaduras( 5, 8, 23).

**Parámetros cinéticos de la enzima soluble e inmovilizada.** Los resultados son mostrados en la figura 4. El comportamiento cinético de la enzima soluble e inmovilizada se determinó sobre lactosa como sustrato, a pH óptimo y 40°C, obteniéndose valores de Km de 15 y 49 mM y Vm de 73 micromoles/min/mg de proteína y de 161 micromoles/min/g de

soporte para la enzima soluble e inmovilizada respectivamente. Valores similares para  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus* son reportados (8, 10, 22, 23). La figura 5 muestra el Ki de la enzima inmovilizada. La constante de inhibición (Ki) para galactosa fue de 15 y 44 mM para la enzima soluble e inmovilizada respectivamente. El Ki de la enzima inmovilizada es 3 veces el Ki de la enzima soluble lo que indica una menor afinidad por el inhibidor lo que mejora su aplicación en los procesos de hidrólisis de productos lácteos. Estos valores son similares a los reportados para levaduras (8, 22, 23).

**Estabilidad de la enzima soluble e inmovilizada.** Los resultados de la estabilidad de la enzima soluble e inmovilizada muestran para la enzima soluble una vida media de 56 minutos a 40°C, una hora de vida media es reportado por Illanés (23). La figura 6 muestra la estabilidad de la enzima inmovilizada. La vida media de la enzima inmovilizada fue de 176 minutos a 40°C, para 30°C más de 7 horas y a 25°C la enzima mantiene una

FIG 3 PERFIL DE TEMPERATURA

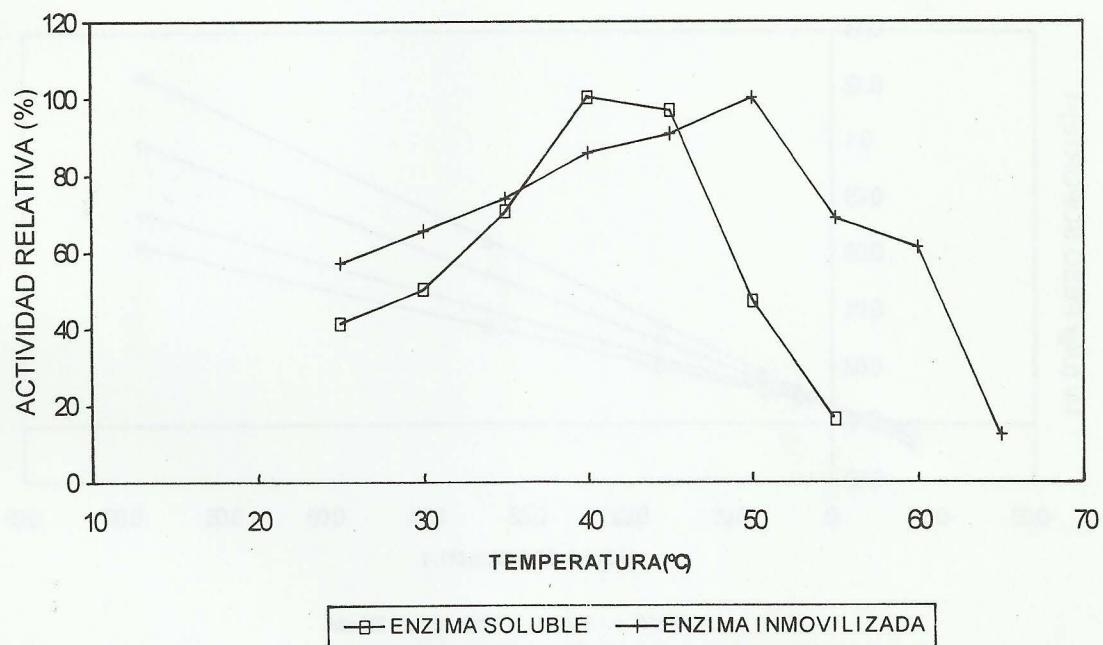
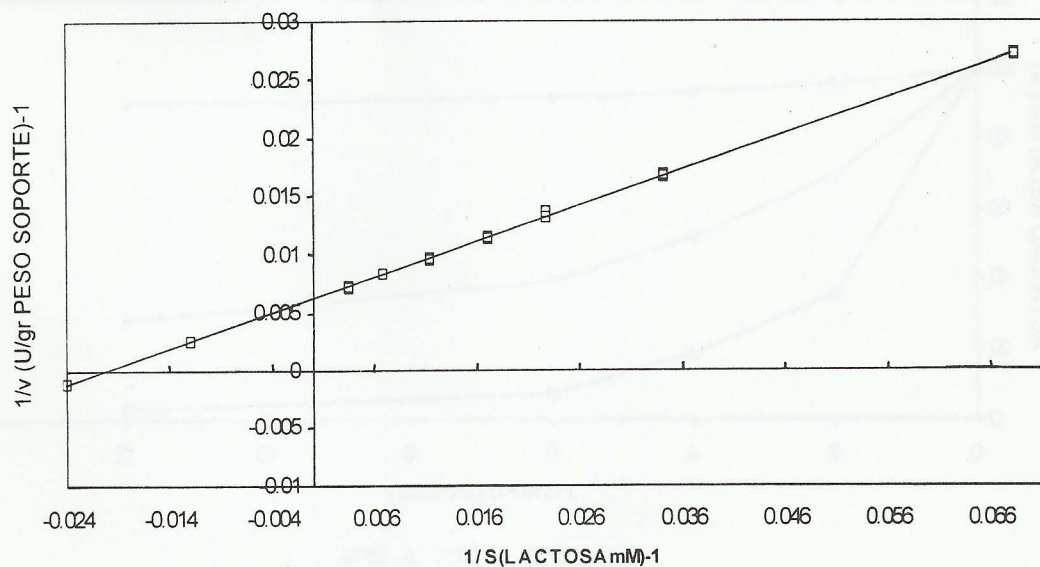
FIG 4 CONSTANTES CINETICAS  $K_m$ ,  $V_m$  ENZIMA INMOVILIZADA



FIG 5 CONSTANTE DE INHIBICION KI ENZIMA INMOVILIZADA

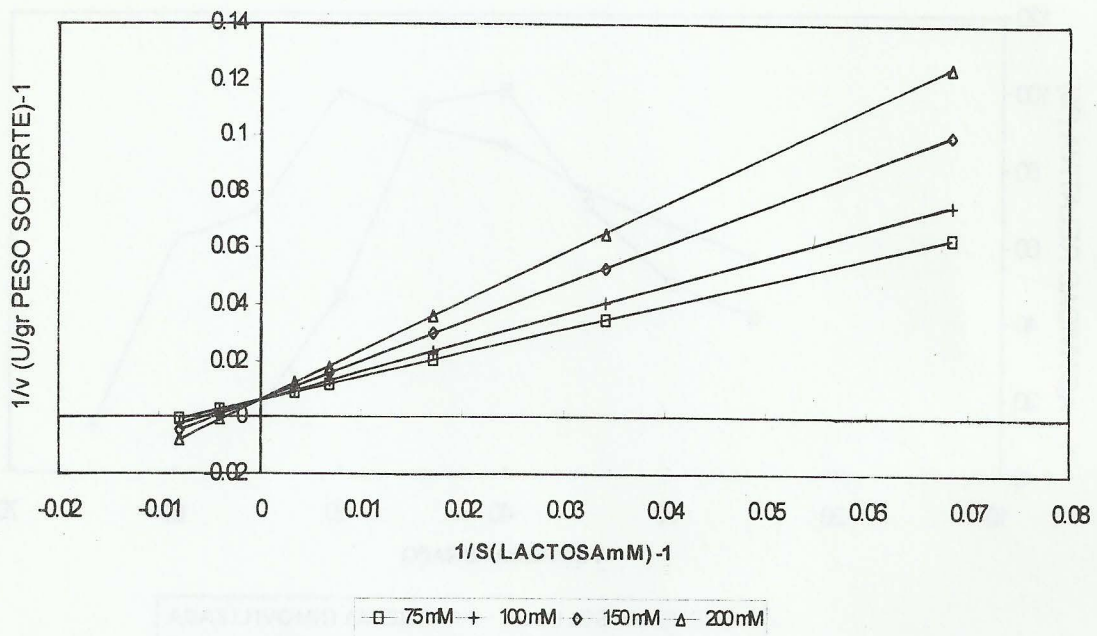
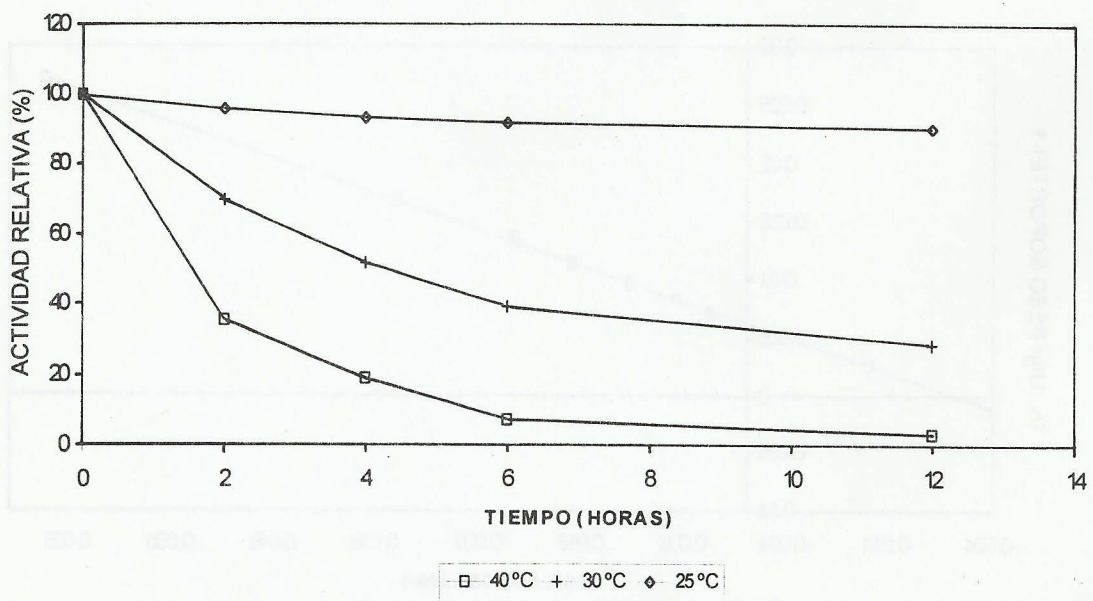


FIG 6 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA





estabilidad de más de 122 horas. Valores similares son reportados (5, 8). En refrigeración (4°C) la estabilidad de la enzima se mantuvo por 90 días sin pérdida significativa de la actividad, ésta característica es importante para su almacenamiento y uso. Resultados similares de 15 días hasta 14 meses, sin pérdida significativa de actividad han sido reportados (9,16, 34). El ditioeritritol mejora la estabilidad de la enzima soluble e inmovilizada (2). Asimismo los cationes  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  mejoran la estabilidad de la enzima (3).

**Capacidad hidrolítica de la enzima inmovilizada.** La capacidad hidrolítica de la enzima en lactosa en solución (4.5%), leche entera y descremada y suero lácteo son mostradas en la **figura 7**. Se observó un 100% de hidrólisis de la lactosa en solución en un tiempo de 70 minutos, mientras que para el mismo tiempo en leche descremada, suero lácteo y leche entera se obtuvieron valores entre 94 a 97% de hidrólisis. La lactosa en solución es hidrolizada más rápidamente que la leche descremada, el suero lácteo y la leche entera debido a que la leche contiene sólidos (proteínas) y cationes ( $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Na^{+}$ ) que inhiben la reacción (1, 12, 28).

**Reutilización de la enzima inmovilizada.** Los resultados de la reutilización de la enzima inmovilizada en leche son mostrados

en la **figura 8**. Se observó una hidrólisis de lactosa por encima del 80% a lo largo de 13 ensayos y descendiendo hasta un 70% de hidrólisis hasta el ensayo N°18. Una hidrólisis de 70 a 80% es considerado como eficiente a nivel industrial (12). Resultados similares entre 8 y 82 ensayos han sido reportados con un 80% de hidrólisis (25, 32, 36). El tiempo de operación del catalizador y no el número de repeticiones es el factor crucial en la reutilización de la enzima inmovilizada (16).

### CONCLUSIONES

La cepa de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109 demostró ser la mejor productora de  $\beta$ -galactosidasa sobre medio M-II. Las óptimas condiciones establecidas para la extracción de la enzima incluyeron 2% de tolueno (v/v), 15 horas de tratamiento, a 30°C en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0  $\pm$  0.1, suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso. Se obtuvo un rendimiento de inmovilización de 41%. La vida media de la enzima inmovilizada fue de 176 minutos a 40°C, manteniendo 99% de su actividad por 3 meses a 4°C y reteniendo hasta el 64% de su actividad original aún después de ser usada por 20 veces. La enzima inmovilizada tuvo una capacidad de hidrólisis del 100% sobre lactosa (4.5%), 97% sobre leche descremada, 95% sobre suero lácteo y 94% sobre leche entera.

FIG. 7 HIDROLISIS DE LACTOSA

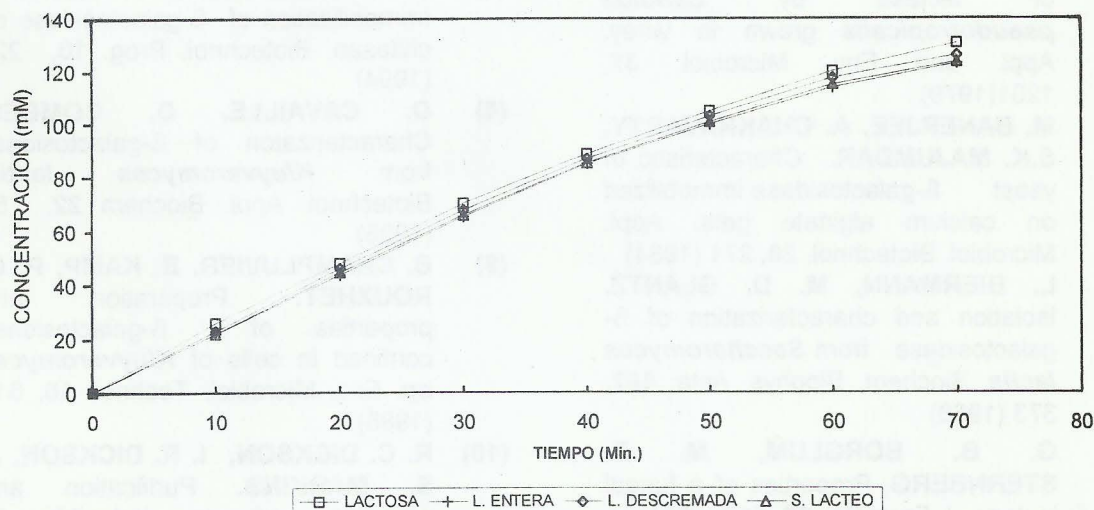
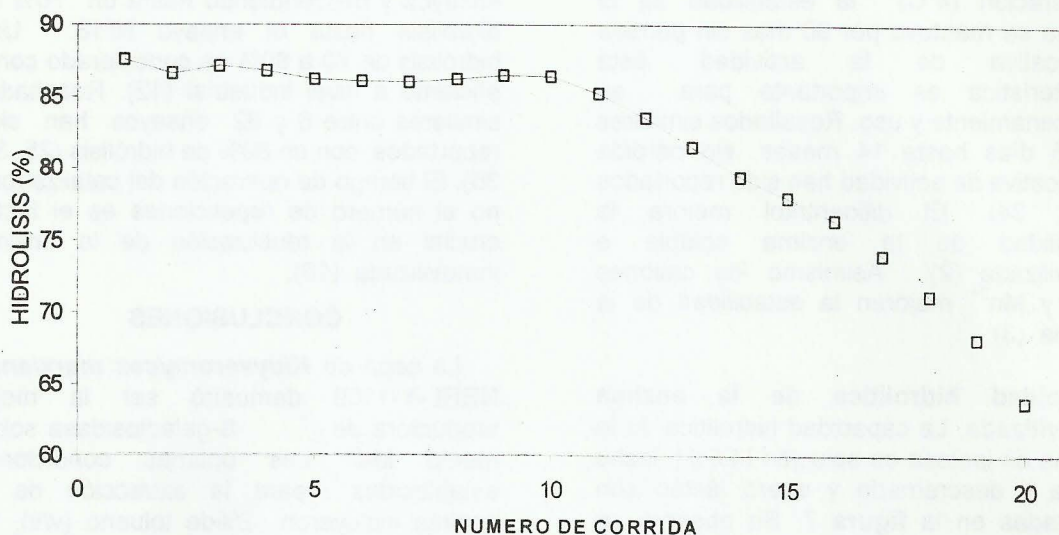




FIG. 8 REUTILIZACION ENZIMA INMOVILIZADA



**Agradecimiento.** El presente trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú CONCYTEC, convenio No.6868-09-94-OAI. El agradecimiento muy especial al Dr. Andrés Illanés Facultad de Bioingeniería U.C. de Valparaíso y a los Magisteres Abad Flores y Enrique Escobar de la Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM por su orientación y apoyo.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) S. BALES, F. CASTILLO. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. *Appl. and Env. Microbiol.* **37**, 1201(1979)
- (2) M. BANERJEE, A. CHAKRAVARTY, S.K. MAJUMDAR. Characteristic of yeast  $\beta$ -galactosidase immobilized on calcium alginate gels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 271 (1984)
- (3) L. BIERMANN, M. D. GLANTZ. Isolation and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Saccharomyces lactis*. *Biochem. Biophys. Acta*, **167**, 373 (1968)
- (4) G. B. BORGLUM, M. Z. STERNBERG. Properties of a fungal lactase. *J. Food Sci.* **37**, 619 (1971)
- (5) D. BRADY, R. MARCHANT, L. McHALE, A. P. McHALE. Isolation and partial characterization of  $\beta$ -galactosidase activity produced by a Thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. *Enz. Microbiol. Technol.* **17**, 696 (1995)
- (6) P.S. BUNTING, K. J. LAIDLER. Kinetic studies on solid-supported  $\beta$ -galactosidase. *Biochem.* **11**, 4477 (1972)
- (7) C. R. CARRARA, A. C. RUBIOLO. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on chitosan. *Biotechnol. Prog.* **10**, 220 (1994)
- (8) D. CAVAILLE, D. COMBES. Characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol. Appl. Biochem* **22**, 55 (1995)
- (9) B. CHAMPLUVIER, B. KAMP, P. G. ROUXHET. Preparation and properties of  $\beta$ -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces sp.* *Enz. Microbiol. Technol.* **10**, 611 (1988)
- (10) R. C. DICKSON, I. R. DICKSON, J. S. MARKINS. Purification and properties of an inducible  $\beta$ -



- galactosidase isolated from yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bact.* **137**, 51 (1979)
- (11) D. M. FENTON. Solvent treatment for  $\beta$ -galactosidase release from yeast cells. *Enz. Microbiol. Technol.* **4**, 229 (1982)
- (12) M. V. FLORES, C. E. VOGET, R. J. J. ERTOLA. Stabilization of a cell biocatalyst with  $\beta$ -galactosidase activity by glutaraldehyde treatment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **64**, 353 (1995)
- (13) M. GARCIA-GARIBAY, J. TORRES, A. LOPEZ MUNGUIA, L. T. CASAS. Influence of oxygen transfer rate on  $\beta$ -galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Letters* **9**, 417 (1987)
- (14) M. I. GONZALEZ SISO, A. FREIRE, E. RAMIL, E. R. BELMONTE, A. R. TORRES, E. CERDAN. Covalent immobilization of  $\beta$ -galactosidase on corn grits: A system for lactose hydrolysis without diffusional resistance. *Process Biochem.* **29**, 7 (1994)
- (15) C. GREENBERG, R. R. MAHONEY. A rapid purification of  $\beta$ -galactosidase (*Aspergillus niger*) from a commercial preparation. *J. Food Sci.* **46**, 684 (1981)
- (16) P. J. HALLING, P. DUNNILL. Hydrolysis of lactose in milk by lactase immobilized to a non-porous magnetic support. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 27 (1979)
- (17) V. H. HOLSINGER. Applications of lactose-modified milk and whey. *Food Technol.* **32**, 38(1978)
- (18) A. ILLANES, M. E. ZUÑIGA, R. CHAMY, M. P. MARCHESE. Immobilization of lactase and invertase on cross linked chitin. In *Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells*. (De. Moo-Young M) Edt. Elsevier Appl. Sci. London 233-249, (1988)
- (19) A. ILLANES, M. E. ZUÑIGA, A. RUIZ. Inmovilización de lactasa microbiana. *Arh. Biol. Exp.* **23**, 159. Printed in Chile (1990a)
- (20) A. ILLANES, M. E. ZUÑIGA, A. RUIZ, C. AGUIRRE, S. O'REILLY, E. CUROTTO. Immobilization of lactase for the continuous hydrolysis of whey permeate. *Bioprocess Eng.* **5**, 257 (1990b)
- (21) A. ILLANES, E. CUROTTO, A. RUIZ, T. VASQUEZ, M. E. ZUÑIGA, M. VASQUEZ. Inmovilización de lactasa de *Kluyveromyces fragilis* en quitina y quitosano. *Actas II Congreso Nacional de Biotecnología M 839- V del Mar.* (1991)
- (22) A. ILLANES, M. E. ZUÑIGA, A. RUIZ. Análisis comparativo de dos lactasas microbianas inmovilizadas. *Alimentos N° 1*, 26(1993)
- (23) A. ILLANES, M. E. ZUÑIGA, A. RUIZ, E. CUROTTO, T. VASQUEZ. Immobilization of yeast lactase on chitin matrices. *Taller Internacional sobre Utilización Industrial de Levaduras U.C.V. Valparaíso Octubre 1-16.* (1994a)
- (23) A. ILLANES. Chitin as a matrix for enzyme immobilization. E. Galindo and O.t. Ramírez (eds): *Advances in Bioprocess Engineering 461-466.* Kluwer Academic Publishers. (1994b)
- (24) R. KAUL, S. F. D'SOUZA, G. B. NADKARNI. Hydrolysis of milk lactose by immobilized  $\beta$ -galactosidase hen egg white powder. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 901 (1984)
- (25) O. B. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
- (27) R. MAHONEY, A. NICKERSON, J. R. WHITAKER. Selection of strains growth condition and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.* **58**, 1620 (1975)
- (28) R. MAHONEY, J. R. WHITAKER. Purification and physico-chemical properties of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Sci.* **43**, 584 (1978)
- (29) A. J. MAWSON. Yeast biomass production from acid whey permeate. *Biotechnol. Letters* **10**, 503 (1988)



- (30) G. L. MILLER. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426 (1959)
- (31) D. M. PAIGE, E. LEONARDO, A. CORDANO, J. NAKASHIMA, B. ADRIAZEN, G. G. GRAHAM. Lactose intolerance in Peruvian children effect of age and early nutrition. *Am. J. Nutr.* **25**, 297 (1972)
- (32) B. Y. K. RAO, S. S. GODBOLE, S. F. D'SOUZA. Preparation of lactose free milk by fermentation using immobilized *Saccharomyces fragilis*. *Biotechnol. Letters* **10**, 427 (1988)
- (33) S. SANCHEZ, F. J. CASTILLO. Producción, extracción y caracterización parcial de  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* crecida en suero de leche. *Acta Científica Venezolana* **31**, 154 (1980)
- (34) V. SARTO, A. MARZETTI, B. FOCHER.  $\beta$ -D-galactosidase immobilized on solubles matrices: Kinetics and Stability. *Enz. Microbiol. Technol.* **7**, 515 (1985)
- (35) W. L. STANLEY, G. G. WATTERS, B. CHAN, J. M. MERCER. Lactase and other enzymes bound to chitin with glutaraldehyde. *Biotechnol. and Bioeng.* **17**, 315 (1975)
- (36) S. SUNGUR, U. AKBULUT. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto gelatin by glutaraldehyde and chromium (III) acetate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **59**, 306 (1994)
- (37) L. E. WIERZBICKI, F. V. KOSIKOWSKI. Lactase potential of varios microorganisms grown in whey. *J. Dairy Sci.* **56**, 26 (1973)