



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

20016

KSP
taille
9/2/82

PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA AMERICA
LATINA Y EL CARIBE DP/RLA/83/003

DESARROLLO TECNOLOGICO PARA LA OBTENCION DE UNA ENZIMA QUE
HIDROLICE LA LACTOSA DE LECHE Y SUERO

INFORME FINAL

CONTRATO No. 91/082 G
Universidad Católica de Valparaíso
Valparaíso, Chile

**DESARROLLO TECNOLOGICO PARA LA OBTENCION DE UNA
ENZIMA QUE HIDROLICE LACTOSA EN LECHE Y SUERO**

8º INFORME DE AVANCE

- Caracterización cinética de catalizadores**
- Estabilidad operacional de catalizadores**

Preparado por:

Andrés Illianes

Andrea Ruiz

M. Elvira Zuñiga

Valparaiso, abril 1992.

PRESENTACION

El presente informe, octavo y segundo correspondiente al tercer año de ejecución del proyecto, contiene la información relativa al desarrollo de las actividades correspondientes a los últimos cinco meses de este tercer año, de acuerdo al plan de trabajo comprometido en el documento Términos de Referencia.

Con ello se da por concluida la participación de instituciones chilenas en el proyecto, cuya tarea fue la de desarrollar la tecnología para producir un catalizador enzimático por inmovilización de lactasa extraída de células de *Kluyveromyces fragilis* y parcialmente purificada.

El trabajo desarrollado se encuentra contenido en los ocho informes de avance cuyo contenido en forma resumida es el siguiente:

- Puesta a punto de las metodologías de producción de la enzima. | 7
- Adaptación de las técnicas de producción desarrolladas por el grupo de trabajo mexicano
- Estudio comparativo de extracción de lactasa por permeabilización y disrupción mecánica de células de *K. fragilis*.
- Estudio de purificación de la enzima por precipitación fraccional

con etanol.

- Estudio de estabilización de la enzima cruda y parcialmente purificada

- Preselección de soportes y metodologías de inmovilización.

- Desarrollo de una metodología para la producción de quitina a partir de caparazones de camarón

- Desarrollo experimental y evaluación de los protocolos de inmovilización en quitina, nylon y soportes hidrofóbicos de Lactozym Novo, considerada como un simil comercial de la lactasa producida en el marco del proyecto.

- Selección de soportes y metodologías de inmovilización en base a los resultados anteriores.

- Optimización del proceso de inmovilización de Lactozym en quitina activada.

- Transferencia de la información obtenida con Lactozym a la lactasa parcialmente purificada producida.

- Optimización del proceso de inmovilización de lactasa parcialmente purificada en quitina activada.

levadura y constituye una restricción al uso del catalizador producido.

El desarrollo del proyecto ha motivado el interés de la industria láctea nacional. Una de dichas empresas, que ha acompañado el desarrollo del proyecto, ha copatrocinado con nuestra Escuela de Ingeniería Bioquímica un proyecto presentado al Fondo Nacional de Fomento (FONDEF) sobre el escalamiento a nivel piloto de la tecnología de producción de lactasa de levadura para su empleo en la industria láctea nacional. El proyecto ha sido ya preseleccionado en una muestra que representa el 30% de los proyectos presentados y se encuentra enfrentando una segunda etapa de evaluación. Estimamos que este hecho constituye de por sí un criterio de éxito desde la perspectiva de los objetivos del proyecto PNUD/ONUDI y esperamos que su eventual aprobación permita dar un paso importante en el proceso de transferencia tecnológica al sector productivo. El interés de la industria láctea nacional en esta enzima es notable, toda vez que la demanda ha aumentado exponencialmente durante los últimos años como consecuencia, principalmente, de su aplicación masiva en la elaboración del dulce de leche y otros productos lácteos similares. La enzima es actualmente importada en su totalidad, existiendo interés a nivel gubernamental por explorar la posibilidad de sustitución por un producto elaborado en el país.

Aunque no representa una actividad comprometida de nuestro país en

el marco del proyecto, se está realizando actualmente un estudio de eváluación técnico económico para la producción en Chile de lactasa de levadura, que considera información generada por el proyecto. Se estima que el estudio estará concluido en el mes de julio, arrojando importante información en relación a la viabilidad de transferencia tecnológica al sector productivo. Dicho estudio se pondrá a disposición de la Coordinación del Programa si lo estimare conveniente.

B o C

D. CARACTERIZACION CINETICA DEL BIOCATALIZADOR PRODUCIDO.

Se proporcionan los resultados de los estudios cinéticos realizados con lactasa producida por fermentación con Kluyveromyces fragilis, recuperación por ruptura mecánica en un molino de perlas de vidrio, partición bifásica y purificación parcial por precipitación fraccional con etanol, de acuerdo al procedimiento desarrollado y reportado en los Informes de Avance precedentes. Para el caso de la lactasa inmovilizada, se siguió el procedimiento optimizado para quitina activada, previamente informado.

Se realizaron las siguientes experiencias:

- Determinación del pH y temperatura óptimos de la lactasa soluble producida de acuerdo a la metodología indicada.
- Caracterización cinética de la enzima soluble a 25 y 40 °C.
- Caracterización cinética del catalizador producido por inmovilización de lactasa en quitina entrecruzado con glutaraldehído a 25 °C.
- Determinación de las restricciones difusionales externas a 25 °C de la enzima inmovilizada.

D.1. METODOLOGIA

Producción de la Enzima.

Las células de Kluyveromyces fragilis obtenidas en cultivo por

lotes son cosechadas al final de la fase de crecimiento exponencial, centrifugadas y lavadas, obteniéndose una pasta húmeda que contiene la enzima.

La extracción de la enzima lactasa se efectúa por ruptura mecánica bajo refrigeración en un molino de perlas de vidrio. Posteriormente la enzima es recuperada al separar con PEG 400 los fragmentos celulares.

La purificación de la enzima se realiza por precipitación fraccional con etanol a baja temperatura y redisolución del pellet obtenido, recuperándose así la enzima parcialmente purificada.

Las condiciones en que se desarrollan estas operaciones han sido previamente reportadas en los Informes de Avance N° 2 y 6.

Inmovilización de lactasa parcialmente purificada en quitina activada.

Se pesaron 1.25 g de quitina, la que fue activada con glutaraldehído a temperatura ambiente, durante 20 h. El glutaraldehído no contactado fue retirado a través de lavados sucesivos con agua destilada.

Posteriormente se contactó la enzima al soporte activado, agregándose tampón fosfato pH 8.5 . Se mezcla suavemente y se deja por 20 h a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo, la enzima es lavada con tampón fosfato pH 6.6 diluido 1/5 (el tampón debe estar frío).

Se realizaron lavados con NaCl 0.5 M a pH 7.0 para retirar la enzima adsorbida no inmovilizada; posteriormente se realizaron lavados con tampón diluido para eliminar los residuos de sal. Después de este tratamiento la enzima se almacena en tampón fosfato pH 6.6 con 1mM de DTE a 4°C

Determinación de la temperatura y pH óptimos de la lactasa soluble parcialmente purificada.

Para determinar la temperatura y pH óptimos analíticos de la enzima soluble, se trabajó en los siguientes rangos:

Temperatura: 25 - 65 °C

pH : 5 - 7.5

La concentración de lactosa empleada fue de 200 g/l. Para la determinación de la temperatura óptima la solución se preparó en tampón fosfato 0.1 M, pH 6.6. y fuerza iónica constante de 0.17 M.

Para la determinación del pH óptimo se utilizó tampón fosfato de fuerza iónica constante de 0.104 M.

Caracterización cinética de la enzima soluble a 40 y 25 °C.

A cada temperatura se realizó una caracterización cinética de la enzima soluble parcialmente purificada utilizando lactosa como sustrato.

Se determinó la velocidad inicial de reacción del catalizador para concentraciones de sustrato en el rango de 5 - 200 (g/l), en tampón fosfato 0.1 M, pH 6.6 y a 40 °C. Posteriormente, utilizando el método de linealización de los inversos de Lineweaver-Burke se determinó el valor de la constante de afinidad enzima sustrato de la ecuación cinética de Michaelis-Menten (K_m).

Experiencias preliminares indicaban que la enzima es inhibida por galactosa y que no se aprecia efecto de la glucosa. Para determinar la constante cinética de inhibición se determinó la velocidad inicial de reacción del catalizador para varias concentraciones de sustrato en presencia de galactosa 100 mM. Una vez obtenidos los resultados se construyó el gráfico Lineweaver-Burke para determinar el tipo de inhibición.

Caracterización cinética a 25 °C de la enzima inmovilizada.

Debido a la inestabilidad de la enzima a 40 °C (ver Informe N° 7 y actividad E de este informe) fue necesario evaluar los parámetros cinéticos a 25 °C, a fin de evaluar posteriormente el comportamiento de un reactor enzimático de operación continua a esa temperatura.

La lactasa fue inmovilizada en quitina según el protocolo antes descrito. Al igual que la enzima en solución se midieron las velocidades iniciales de reacción para concentraciones de sustrato en el rango 5 - 200 (g/l), en tampón fosfato 0.1 M, pH 6.6 a 25 °C.

Experiencias realizadas a otras temperaturas indicaban que la enzima es inhibida por galactosa, no apreciándose efecto de la glucosa. Por ello se diseñó la experiencia para evaluar el efecto inhibitorio por galactosa, realizándose mediciones de velocidad de reacción en el mismo rango de concentraciones de lactosa a una concentración de galactosa 100 mM.

Restricciones difusionales externas.

Para determinar las posibles restricciones difusionales externas

de la enzima inmovilizada en quitina activada se utilizó el procedimiento propuesto por Messing (1), que se basa en la medición de velocidades iniciales de reacción en rangos de alta y baja concentración de sustrato y el análisis de las respectivas pendientes obtenidas al graficar los datos en un gráfico de inversos tipo Lineweaver-Burke.

A los datos obtenidos previamente en el rango de alta concentración de sustrato (5-200 g/l) se agregó un conjunto de valores obtenidos en un rango de 1.25 a 5 g/l de lactosa. Todas las soluciones de lactosa fueron preparadas en tampón fosfato 0.1 M, pH 6.6. Las experiencias se realizaron a 25 °C. El procedimiento permite obtener la pendiente en ese rango y compararla con la obtenida en el rango de alta concentración de sustrato.

La magnitud de las restricciones difusionales externas es determinada a través del número de Damköhler (N), que se determina de acuerdo al procedimiento propuesto por, según la siguiente ecuación:

$$N = 1 - M2 / M1$$

Donde:

M1: Pendiente obtenida a altas concentraciones de sustrato.

M2: Pendiente obtenida a bajas concentraciones de sustrato.

D.2. RESULTADOS Y DISCUSION

Determinación de la temperatura y pH óptimos de la enzima soluble parcialmente purificada.

Se determinó la temperatura y pH óptimos analíticos (para 10 minutos de tiempo de reacción) de la enzima parcialmente purificada en su forma soluble. Los resultados de este estudio se presentan en las figuras 1 y 2.

Los valores óptimos analíticos obtenidos fueron los siguientes:

Temperatura : 48 °C

pH : 6.9

Ambos resultados concuerdan con los datos reportados por NOVO para la lactasa comercial Lactozym, que representa un punto de referencia por provenir también de una cepa de K.fragilis.

En la figura 1, se observa que la enzima soluble es afectada en forma significativa por la temperatura, ya que su actividad disminuye bruscamente por sobre y por debajo de la temperatura óptima.

En la figura 2 se muestra el perfil de pH para la enzima soluble,

donde se aprecia un amplio rango de pH en que la actividad enzimática está por sobre un 80% de su valor máximo. Se observa que a pH por sobre el óptimo, la actividad disminuye bruscamente, siendo esta caída más suave hacia el lado ácido.

Caracterización cinética de la enzima soluble a 40 y 25 °C.

Se determinaron las constantes cinéticas para la enzima soluble, siguiendo la metodología indicada precedentemente.

La figura 3 muestra la dependencia de la velocidad de reacción respecto a la concentración del sustrato lactosa a 40 °C. Se aprecia que la enzima soluble presenta inhibición por alta concentración de lactosa, lo que se hace manifiesto por sobre los 50 g/l, confirmando resultados reportados anteriormente en un sistema similar (2).

A partir de la figura 4 se determinó la constante de inhibición por alta concentración de sustrato a 40 °C, la que fue de 945.9 mM. Este valor es bastante elevado si se le compara con valores usuales para enzimas que han sufrido este efecto. Ello significa que el efecto inhibitorio de la lactosa es muy poco significativo y, dada la limitada solubilidad de la lactosa, puede considerarse despreciable desde un punto de vista práctico.

En la gráfica de inversos tipo Lineweaver-Burke de las figuras 5 y 6 se entregan los resultados obtenidos en la evaluación cinética del catalizador a 40 °C. De la figura 6 puede apreciarse el tipo de inhibición competitiva por galactosa, que es característico de las lactasa tanto fungales como de levadura. Los valores obtenidos son:

$$V_m = 352.3 \quad (\text{umoles/min} \cdot \text{ml})$$

$$K_m = 4.6 \quad (\text{g/l}) \quad (= 13.5 \text{ mM})$$

$$K_i : 13.2 \quad (\text{g/l}) \quad (= 73.2 \text{ mM})$$

El valor de K_m obtenido, resultó algo menor que el de 17.2 mM, reportado en el 4º Informe de Avance para la lactasa comercial Lactozym en las mismas condiciones. Ello implica que la lactasa parcialmente purificada producida en el marco del proyecto presenta una mayor afinidad por el sustrato que el referente comercial, lo que es un elemento positivo.

A partir de la figura 6 pudo determinarse que la enzima soluble es inhibida competitivamente en forma total por galactosa, lo que es congruente con la información bibliográfica referente a lactasas de K.fragilis y K.lactis.

El valor del K_i resultó algo superior que el de 65.9, reportado

para Lactozym en el 4º Informe de Avance, lo que representa un aspecto favorable de la enzima producida, al indicar una menor sensibilidad al efecto de inhibición por galactosa que la enzima comercial.

La figura 7 muestra la dependencia de la velocidad de reacción respecto a la concentración del sustrato lactosa a 25 °C. Se aprecia también inhibición por alta concentración de lactosa, siendo nuevamente el efecto poco significativo.

En la gráfica de inversos tipo Lineweaver-Burke de las figuras 8 y 9 se entregan los resultados obtenidos en la evaluación cinética del catalizador a 25 °C. De la figura 9 puede apreciarse nuevamente el tipo de inhibición competitiva por galactosa. Los valores obtenidos son:

V_m : 81.5 (umoles/min.ml)
 K_m : 7.4 (g/l) (= 21.6 mM)
 K_i : 20.6 (g/l) (=114.4 mM)

Puede apreciarse el marcado efecto de la temperatura sobre la reactividad del catalizador, que es cuatro veces mayor a 40 que a 25 °C. Por otra parte tanto la constante de afinidad por lactosa como la constante de inhibición por galactosa son mayores a 25 que

a 40 °C. Ello significa que a 25 °C la enzima es menos afin por el sustrato pero significativamente menos sensible al efecto inhibitorio del producto galactosa.

Resulta destacable que, tanto a 40 como a 25 °C, las constantes de inhibición son aproximadamente cinco veces mayores que las respectivas constantes de afinidad. Si se compara estos resultados con los reportados para otras lactasas, especialmente de origen fungal, puede apreciarse que se trata de una enzima menos sensible al efecto de inhibición por galactosa, lo que es de especial relevancia en la operación de reactores enzimáticos, donde la enzima estará en contacto con una alta concentración del producto inhibitorio.

Caracterización cinética a 25 °C de la enzima inmovilizada.

En la determinación de las constantes cinéticas para la enzima inmovilizada se obtuvo a altas concentraciones de sustrato bastante dispersión de los datos, como puede apreciarse en el gráfico de inversos tipo Lineweaver-Burke, que se presenta en la figura 10. Esta dispersión impide determinar con certeza un valor para la constante de inhibición por alta concentración de lactosa. Puede concluirse sí que el fenómeno existe y que su efecto es poco

significativo desde una perspectiva práctica, por las mismas razones señaladas anteriormente para el caso de la lactasa soluble.

Para la evaluación cinética del catalizador se consideró aquellos valores obtenidos a concentraciones de sustrato donde no se manifiesta el efecto inhibitorio. Las figuras 10 y 11 presentan los gráficos de inversos en ausencia y presencia del inhibidor galactosa respectivamente. Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos a partir de esas figuras son los siguientes:

$$V_m : 72.4 \text{ (umoles/min.g)}$$

$$K_m : 16.9 \text{ (g/l)} \quad (= 49.4 \text{ mM})$$

$$K_i : 13.1 \text{ (g/l)} \quad (= 72.7 \text{ mM})$$

Puede nuevamente apreciarse el marcado efecto de la temperatura sobre la reactividad del catalizador, que en este caso es 3.8 veces mayor a 40 ($V_m = 277$ umoles/min.g; ver Informe de Avance N^o 7) que a 25 °C.

El valor de K_m aparente obtenido para la enzima inmovilizada a 25 °C es mayor que el obtenido para su contraparte soluble, lo que plantea la existencia de restricciones difusionales internas, aunque de poca magnitud. En efecto, el valor del K_m de la lactasa inmovilizada es 2.3 veces mayor que el de su contraparte soluble,

lo que puede compararse muy favorablemente con resultados usuales obtenidos con enzimas inmovilizadas donde es frecuente observar diferencias de más de un orden de magnitud.

El valor del K_i obtenido para la enzima inmovilizada resultó cerca de un 35 % menor que el de su contraparte soluble (un resultado muy similar se había obtenido a 40 °C; ver Informe de Avance N° 7), indicando que la enzima inmovilizada es algo más sensible al efecto inhibitorio que la enzima soluble.

El K_m obtenido para la enzima inmovilizada a 25 °C es similar al valor reportado de 53 mM a 40 °C (Ver Informe de Avance N° 7). Ello permite concluir que el valor de este parámetro no es afectado de manera significativa por la temperatura. Conclusiones similares pueden obtenerse en otros sistemas enzimáticos.

La afinidad aparente levemente superior observada a 25 °C, puede atribuirse a la menor reactividad del catalizador enzimático a baja temperatura, que tiende a minimizar el efecto de restricciones difusionales, reflejándose en el valor de la constante de afinidad aparente. Dado que no existe una gran incidencia de restricciones difusionales, estas diferencias también son poco significativas.

La constante de inhibición por galactosa de la enzima inmovilizada

en cambio resultó bastante mayor a 25 que a 40 °C ($K_i = 44.5$; ver Informe de Avance N° 7), lo que implica un efecto inhibitorio mucho menos marcado a baja temperatura, lo que también es atribuible a la incidencia del fenómeno de restricción difusional que minimiza el efecto inhibitorio (3).

En la Tabla 1 se presenta un resumen de los valores de los parámetros cinéticos obtenidos, tanto para las lactasas inmovilizadas en quitina activada, como para sus contrapartes solubles.

Tabla 1. Resumen de valores obtenidos para los parámetros cinéticos de lactasa inmovilizada en quitina activada y lactasa soluble.

	E25	EI25	E40	ENOV040	EI40
K_m^a	21.6	49.4	13.5	17.2	53
K_i^a	114.4	72.7	73.2	65.9	44.5
V_m	81.5 ^b	72.4 ^a	352.3 ^b		277 ^a

a : mM
b : $\mu\text{moles}/\text{min.ml}$
c : $\mu\text{moles}/\text{min.g}$
E : enzima soluble
EI: enzima inmovilizada

Restricciones difusionales externas

A partir de la figura 12 se obtuvo el número de Damköhler (N) para el catalizador inmovilizado a 25 °C, resultando ser de 0.37. Este valor indica que aunque existen restricciones difusionales externas, éstas son de poca consideración, implicando que a esta temperatura la velocidad de reacción está controlada por la cinética enzimática y no por la velocidad de transporte de reactantes. Ello podría resultar diferente a 40 °C, donde la mayor reactividad del catalizador enzimático hiciera tender el sistema hacia la zona de limitación por transporte.

CONCLUSIONES

En relación a la caracterización cinética puede concluirse lo siguiente:

- La temperatura y pH óptimos analíticos para la enzima soluble son 48 °C y 6.9 respectivamente. No obstante, a esa temperatura la enzima soluble es altamente inestable, por lo que esa temperatura no representa una opción de proceso. Desafortunadamente, la actividad enzimática a temperaturas en que la lactasa soluble presenta una estabilidad aceptable (menos de 30 °C) es de tan solo un 25 a 30 % de la actividad máxima.

- La lactasa producida en el marco del proyecto, tanto en su forma soluble como inmovilizada en quitina, es inhibida en forma competitiva total por galactosa e inhibida por alta concentración del sustrato lactosa. La inhibición por sustrato es despreciable al trabajar a concentraciones de hasta 50 (g/l) de lactosa como ocurre en el suero y permeado de suero, e incluso resulta poco significativo a condiciones de saturación (200 g/l de lactosa), por lo que su significación práctica es escasa.

- A partir de los respectivos valores de K_m y K_i , puede concluirse que la enzima soluble parcialmente purificada presenta mayor afinidad por el sustrato y menor sensibilidad al efecto inhibitorio que su simil comercial Lactozym. Ello es un aspecto positivo en relación a la enzima producida.

- La lactasa inmovilizada en quitina activada presenta a 25°C

restricciones difusionales externas poco considerables, estando la reacción limitada por la capacidad catalítica de la enzima. No puede asegurarse lo mismo a temperaturas superiores, donde la mayor reactividad de la enzima podría llevar al sistema a la región de control por velocidad de transporte.

- En base a un análisis comparativo de los valores de K_m aparente, puede concluirse la baja incidencia de restricciones difusionales internas en la expresión de la capacidad catalítica de la lactasa inmovilizada en quitina activada.

- La enzima inmovilizada es algo más sensible al efecto inhibitorio por galactosa que su contraparte soluble.

Referencias

- (1) Messing, R. (1975). Immobilized Enzymes for Industrial Reactors. Academic Press, New York, pp 151-199.
- (2) Venegas, B. (1990). Estudio cinético de lactasa de levadura libre e inmovilizada en quitina. Informe de Investigación, Escuela de Ingeniería, Universidad Católica de Valparaíso.
- (3) Engasser, J., Horvath, C. (1976). Diffusion and kinetics with immobilized enzymes. En Applied Biochemistry and Bioengineering 1. Academic Press, New York, pp 127-220.

E. ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO Y ESTABILIDAD OPERACIONAL DEL CATALIZADOR EN CONDICIONES DE OPERACION.

El objetivo de esta actividad es la determinación de la estabilidad del catalizador enzimático en condiciones de operación en la hidrólisis continua de lactosa. Se pretende establecer el tiempo de vida media operacional, cuyo valor permite una idea clara de su potencial de uso en condiciones de proceso.

En el Informe de Avance N° 7 se reportó los resultados obtenidos en la operación continua a 25 °C de un reactor con lactasa inmovilizada en quitina bajo condiciones pseudoestacionarias. Se presenta en este informe los resultados obtenidos en la operación continua por tiempos prolongados a 25 y 40 °C.

E.1. METODOLOGIA

Se realizaron experiencias para determinar la estabilidad de lactasa inmovilizada en quitina en la operación de reactores continuos de columna empacada.

La ecuación que describe el comportamiento en estado estacionario del reactor de cama empacada con una enzima inmovilizada, que es inhibida en forma competitiva por uno de sus productos, asumiendo

régimen de flujo pistón es:

$$\frac{V \cdot P}{F \cdot K_m} = X \cdot S_0 \cdot \left| \frac{1}{K_m} - \frac{1}{K_i} \right| - 1 + \frac{S_0}{K_i} \cdot \ln(1 - X)$$

(ec. 1)

donde

P : Carga de catalizador en el reactor.

F : Flujo de alimentación al reactor.

X : Grado de conversión.

S₀ : Concentración de sustrato en alimentación.

K_m : Constante de Michaelis aparente para lactosa

K_i : Constante de inhibición competitiva aparente por galactosa

Las condiciones de operación fueron las siguientes:

Enzima : Lactasa inmovilizada en quitina activada de acuerdo al procedimiento descrito, con una actividad de 80 (UI/g) medida a 200 (g/l), a 40 °C y pH 6.6.

Sustrato: Solución de lactosa de concentración 40 (g/l) en tampón fosfato pH 6.6, Mg⁺² 1 mM y Mn⁺² 0.1 mM.

Temperatura: Se realizaron experiencias a 25 y 40 °C.

Flujos de operación: Para cada temperatura se utilizó un flujo estimado para obtener una conversión inicial teórica del 90%.

Dichos valores se obtuvieron de la ecuación 1. Los valores

utilizados fueron de 0.73 (ml/min) con un tiempo de residencia de 2.9 h, para 40 °C y 0.33 (ml/min) con un tiempo de residencia de 6.3 h, para 25 °C.

Dimensiones del reactor: Se utilizó un reactor de columna con un diámetro de 4 cm y una altura mayor a la altura alcanzada por la enzima inmovilizada, correspondiente a un volumen de 10 ml.

Carga enzimática del reactor: En cada experiencia se utilizó una carga de 2.75 g de catalizador. La operación del reactor se realizó con flujo ascendente del sustrato. La temperatura se controló mediante circulación de agua a la temperatura de operación a través de la chaqueta del reactor. Durante la operación del reactor se tomaron muestras en el tiempo, a las que se les determinó la concentración de glucosa mediante el método colorimétrico enzimático Merckotest. Con el valor obtenido en estas determinaciones y las relaciones estequiométricas de la reacción de hidrólisis de la lactosa, se determinó el grado de conversión a intervalos de tiempo durante la operación del reactor.

E.2. RESULTADOS Y DISCUSION

En las figuras 13 y 14 se grafican los grados de conversión, expresados como porcentaje del grado de conversión teórico de diseño, obtenidos en función del tiempo de operación del reactor

para las temperaturas estudiadas de 40 y 25 °C respectivamente.

Ambas experiencias fueron diseñadas, a partir de la ec. 1, para una conversión teórica del 90 %, obteniéndose una conversión experimental de estado estacionario de 85 y 86 % para la columna a 25 y 40 °C respectivamente.

Como se aprecia en las figuras 13 y 14, las columnas tardaron en alcanzar el estado estacionario tiempos de 0.5 y 5 horas a 40 y 25 °C, respectivamente.

De la regresión lineal del $\ln(\% \text{ del grado de conversión máximo})$ versus tiempo de operación, que se presenta en las figuras 15 y 16 para los reactores a 40 y 25 °C respectivamente, se determinaron los tiempos de vida operacional, definiéndose como tiempo de vida media operacional al tiempo de operación al cual se tiene un 50% de la conversión inicial. Los valores obtenidos fueron de 8 h para 40 °C y 29 días a 25 °C.

CONCLUSIONES

Del análisis de estabilidad operacional del catalizador producido puede concluirse lo siguiente:

- La lactasa inmovilizada en quitina activada, aunque mucho más estable que su contraparte soluble a 40 °C, puede considerarse aún una enzima termolábil, manteniendo el carácter propio de las lactasas producidas por levaduras. No resulta viable por tanto su utilización en esa condición por períodos prolongados en la hidrólisis continua de suero y permeado de suero.

- La lactasa inmovilizada en quitina presentó una estabilidad operacional muy superior a 25°C. A esta temperatura es posible operar el reactor enzimático por períodos prolongados, aunque ello representa un compromiso de la capacidad catalítica de la enzima, que es significativamente menor a 25 que a 40 °C.

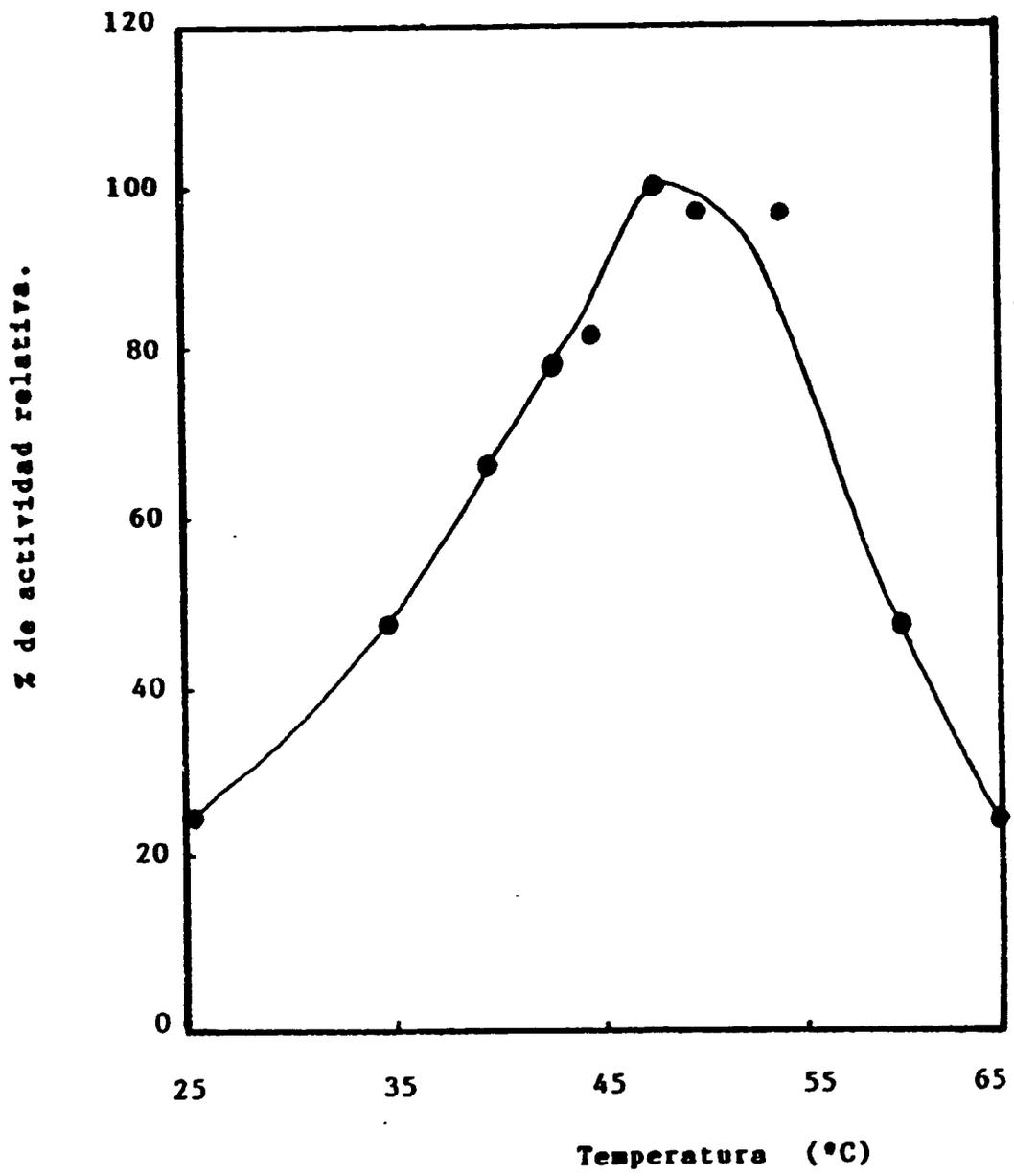


Figura 1: Perfil de temperatura.

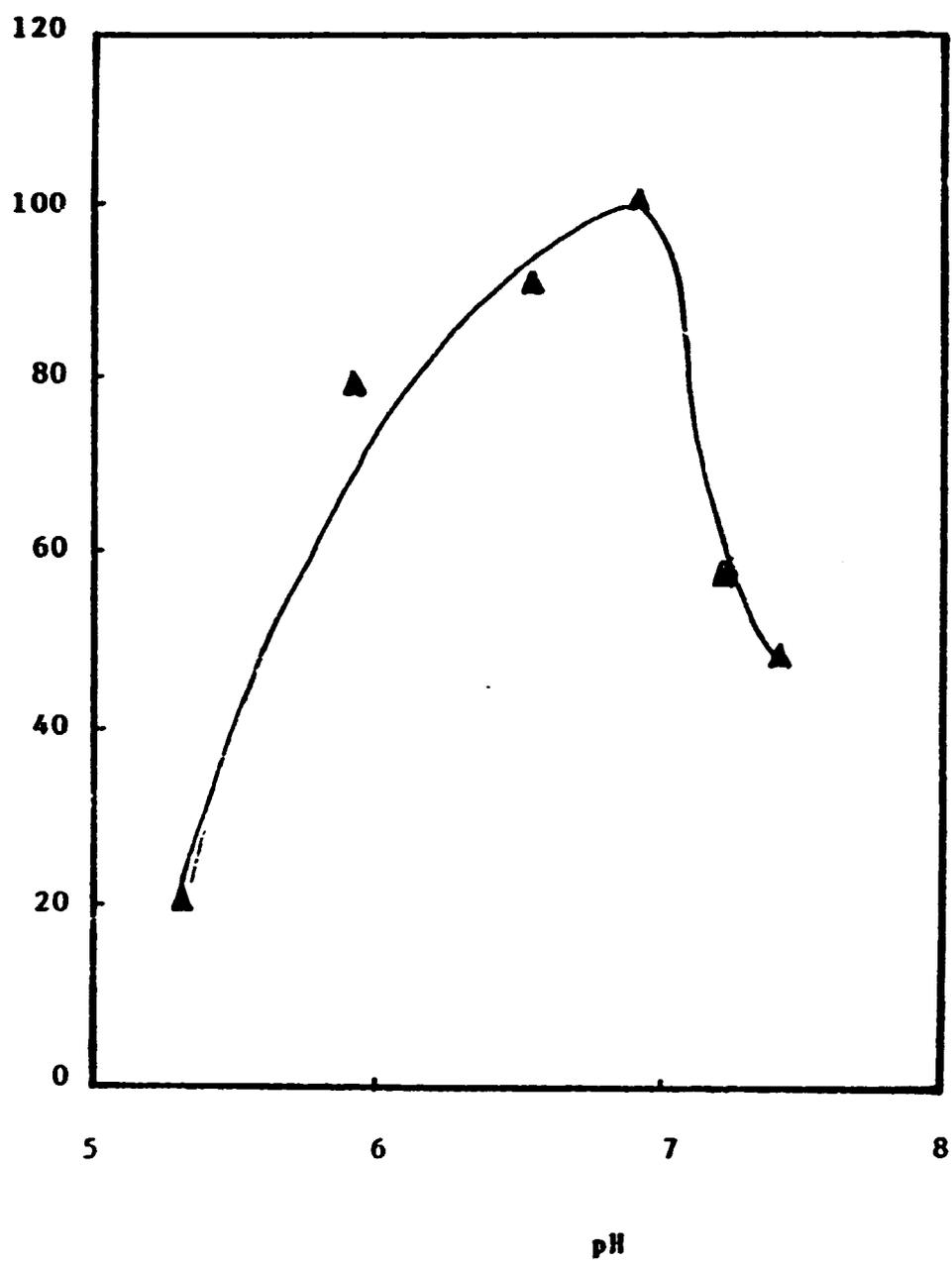


Figura 2: Perfil de pH.

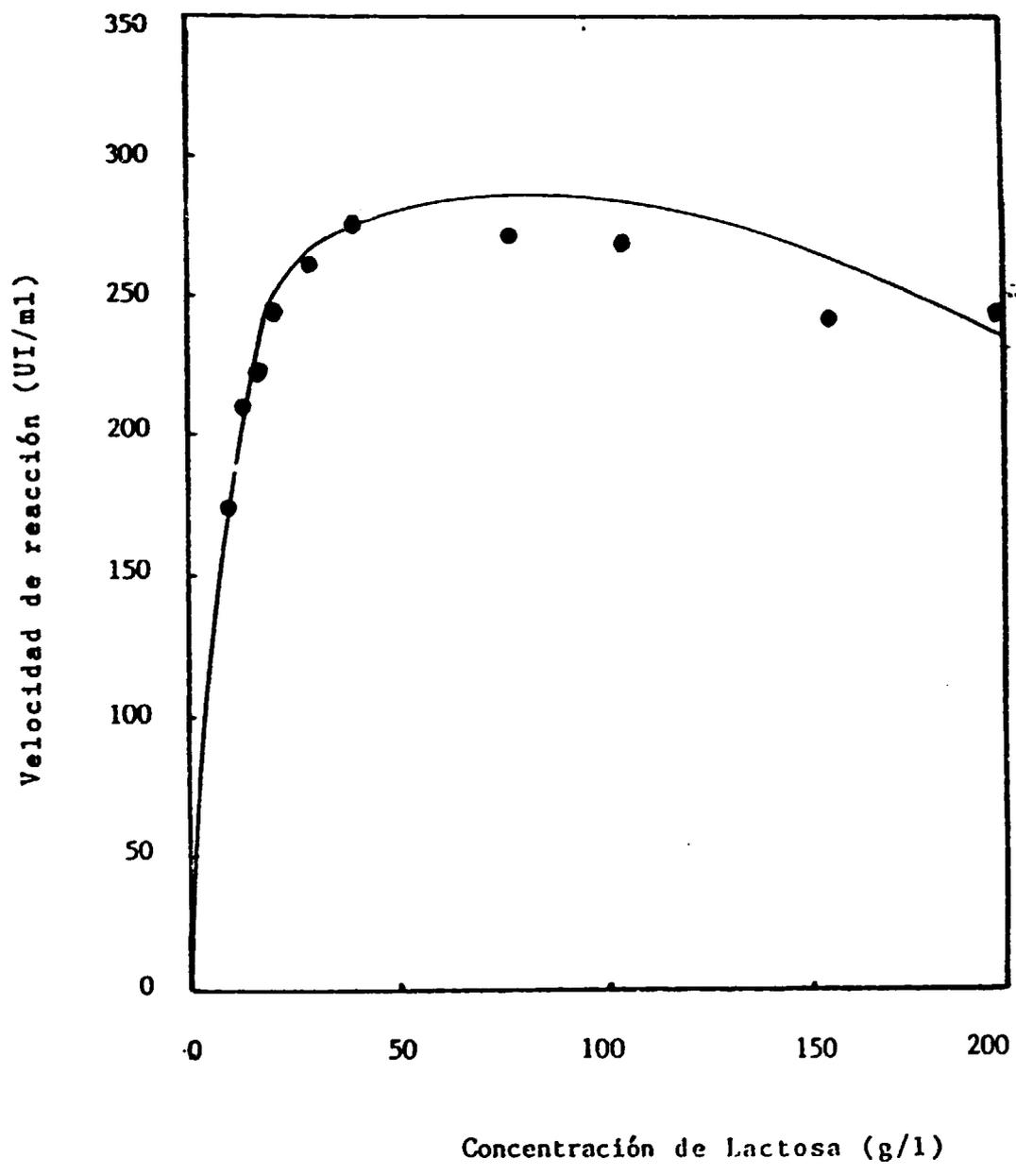


Figura 3: Efecto de la concentración de lactosa en la enzima soluble (pH 6.6 y T=40°C)

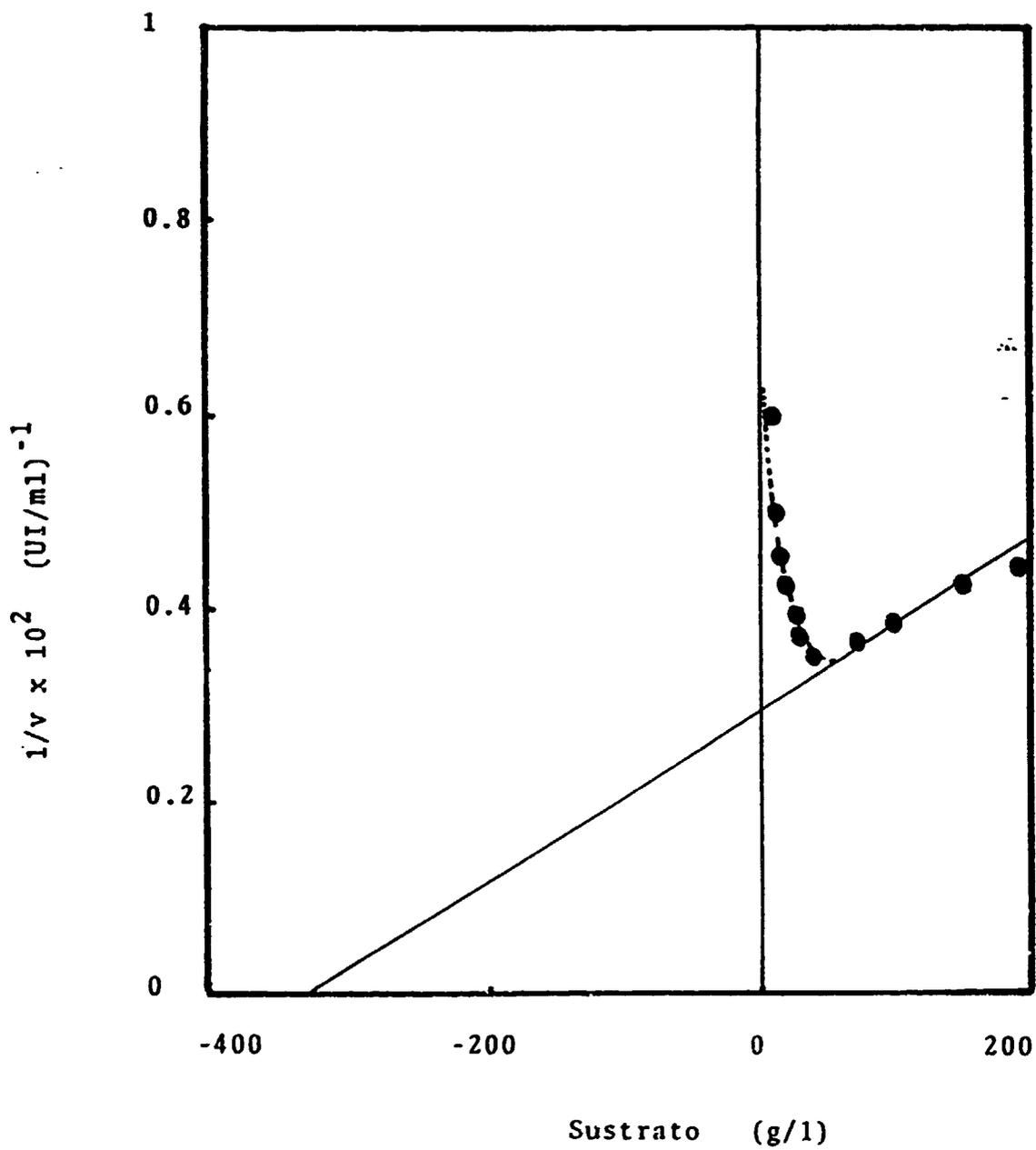


Figura 4: Determinación de la constante de inhibición por sustrato.

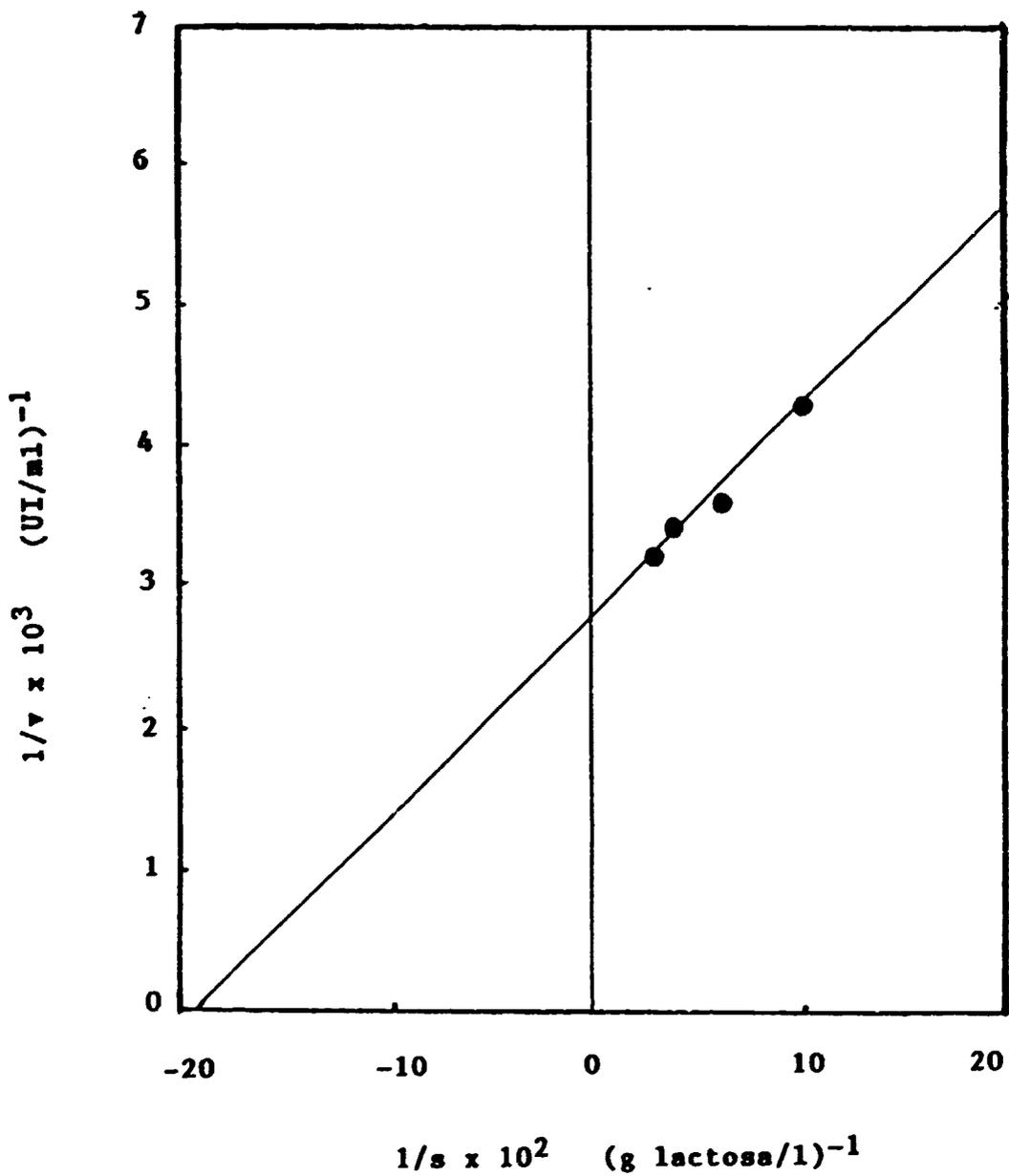


Figura 5: Gráfica para determinar K_m por el método Lineaweaver-Burk en la enzima soluble a pH 6.6 y $T = 40^\circ\text{C}$.

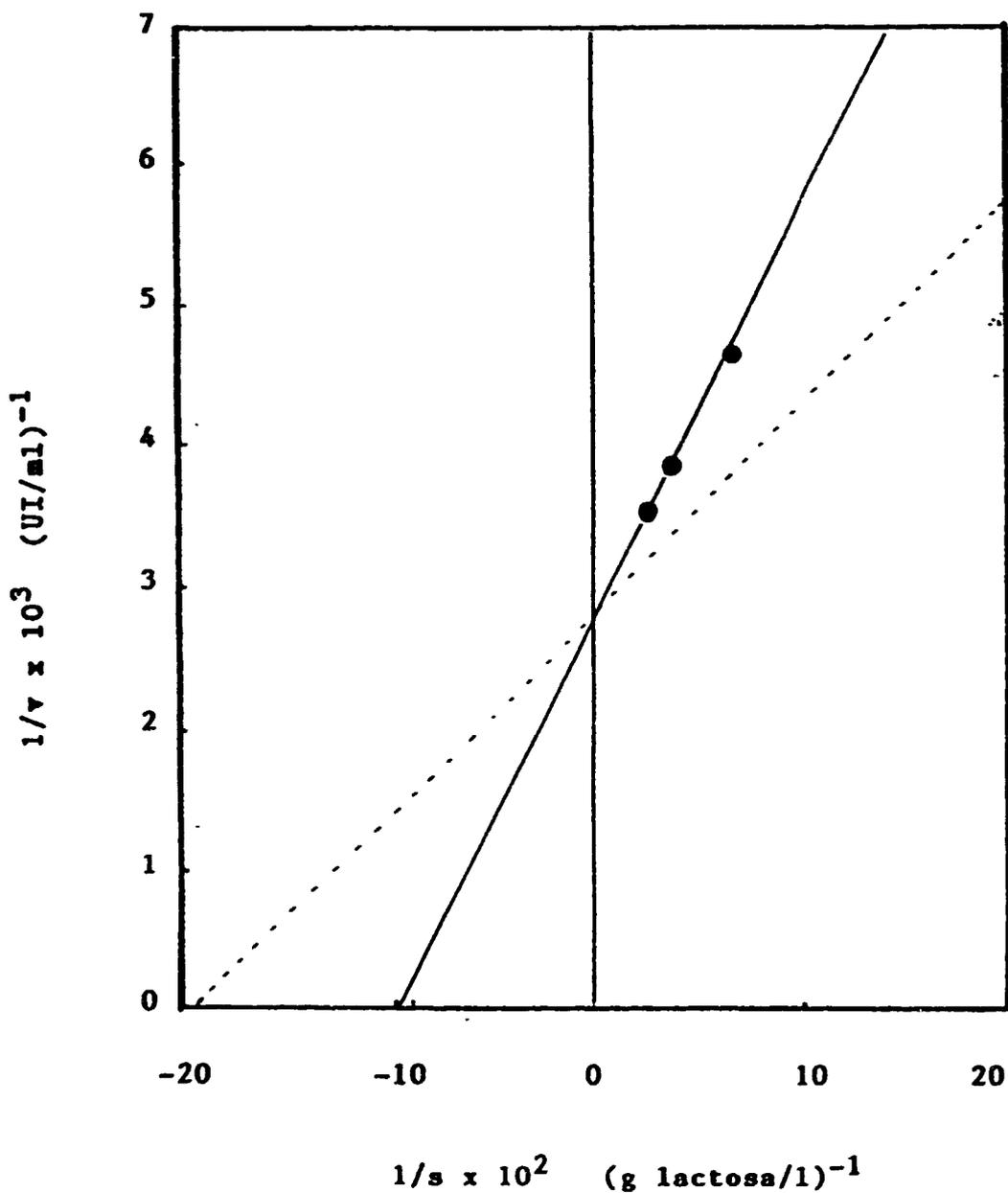


Figura 6: Gráfica para determinar la constante de inhibición por galactosa en la en zima soluble a pH 6.6 y T = 40°C.
 - - - sin galactosa
 —●— con galactosa 100 mM

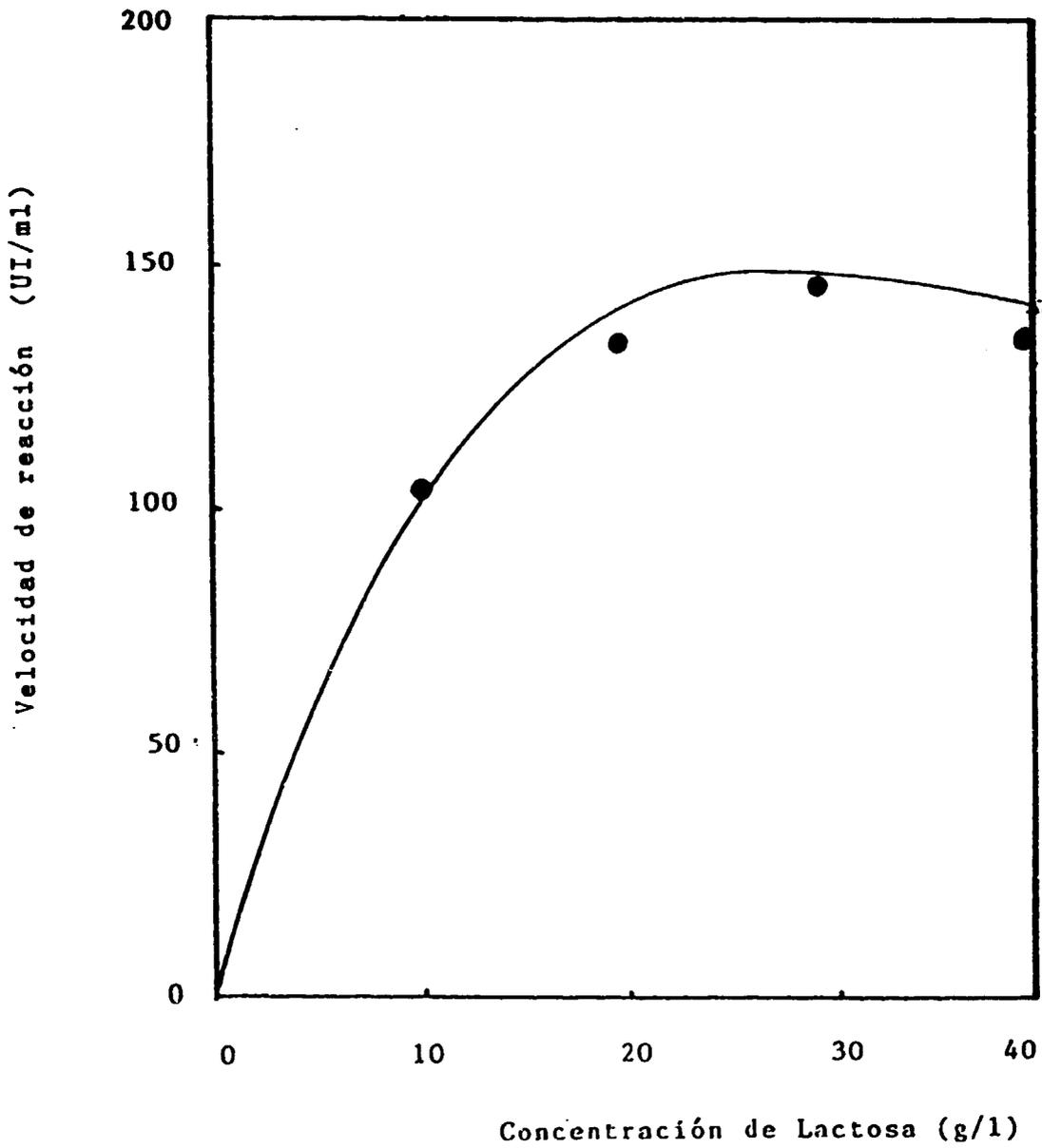


Figura 7: Efecto de la concentración de lactosa en la enzima soluble (pH 6,6 y T=25°C)

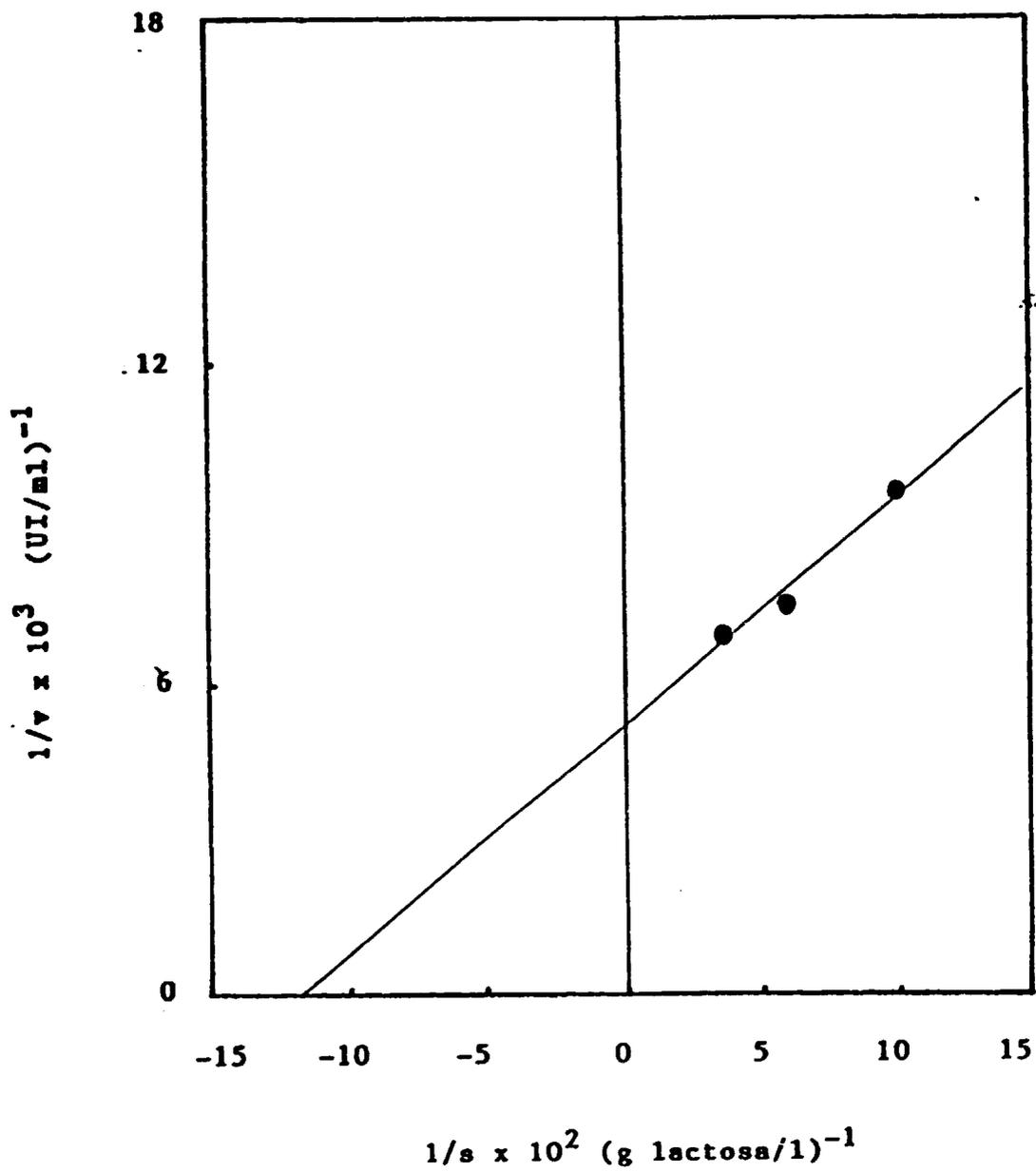


Figura 8: Gráfica para determinar K_m por el método Lineweaver-Burk en la enzima soluble a pH 6.6 y $T = 25^\circ\text{C}$

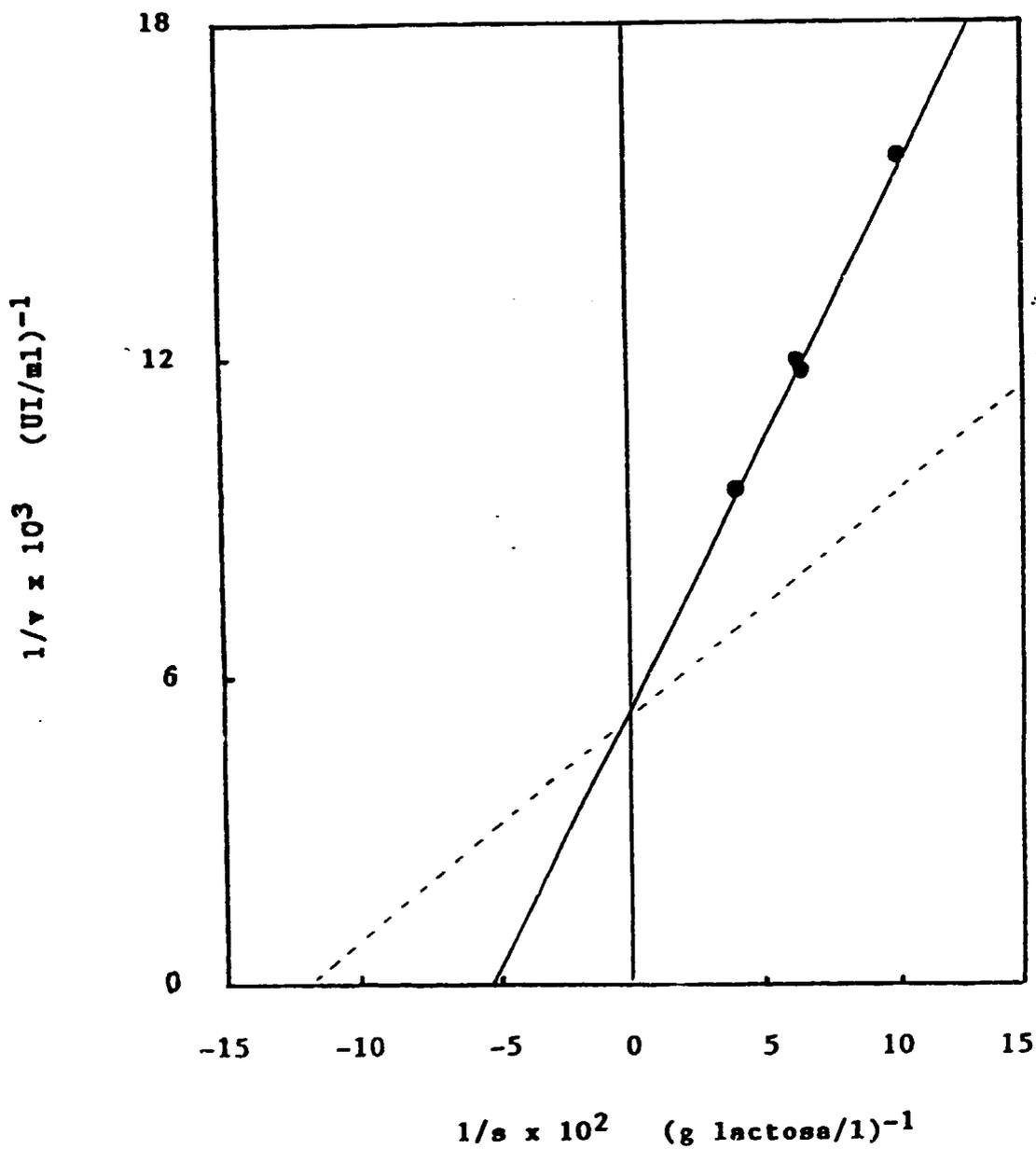


Figura 9: Gráfica para determinar la constante de inhibición por galactosa en la enzima soluble a pH 6.6 y T = 25°C.
 - - - sin galactosa
 —●— con galactosa 100 mM

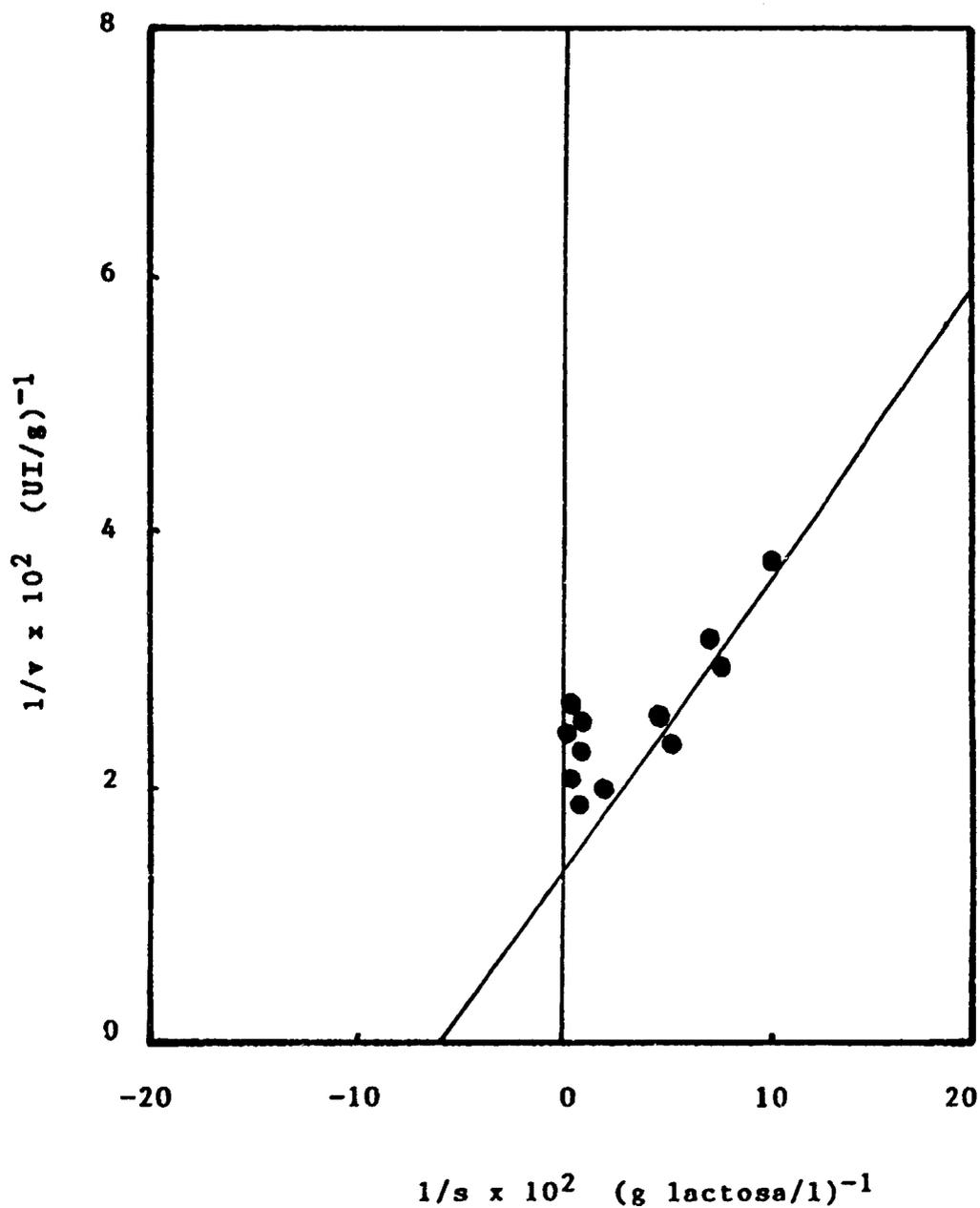


Figura 10: Gráfica para determinar K_m por el método Lineaweaver-Burk en la enzima inmovilizada a $\text{ph } 6.6$ y $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

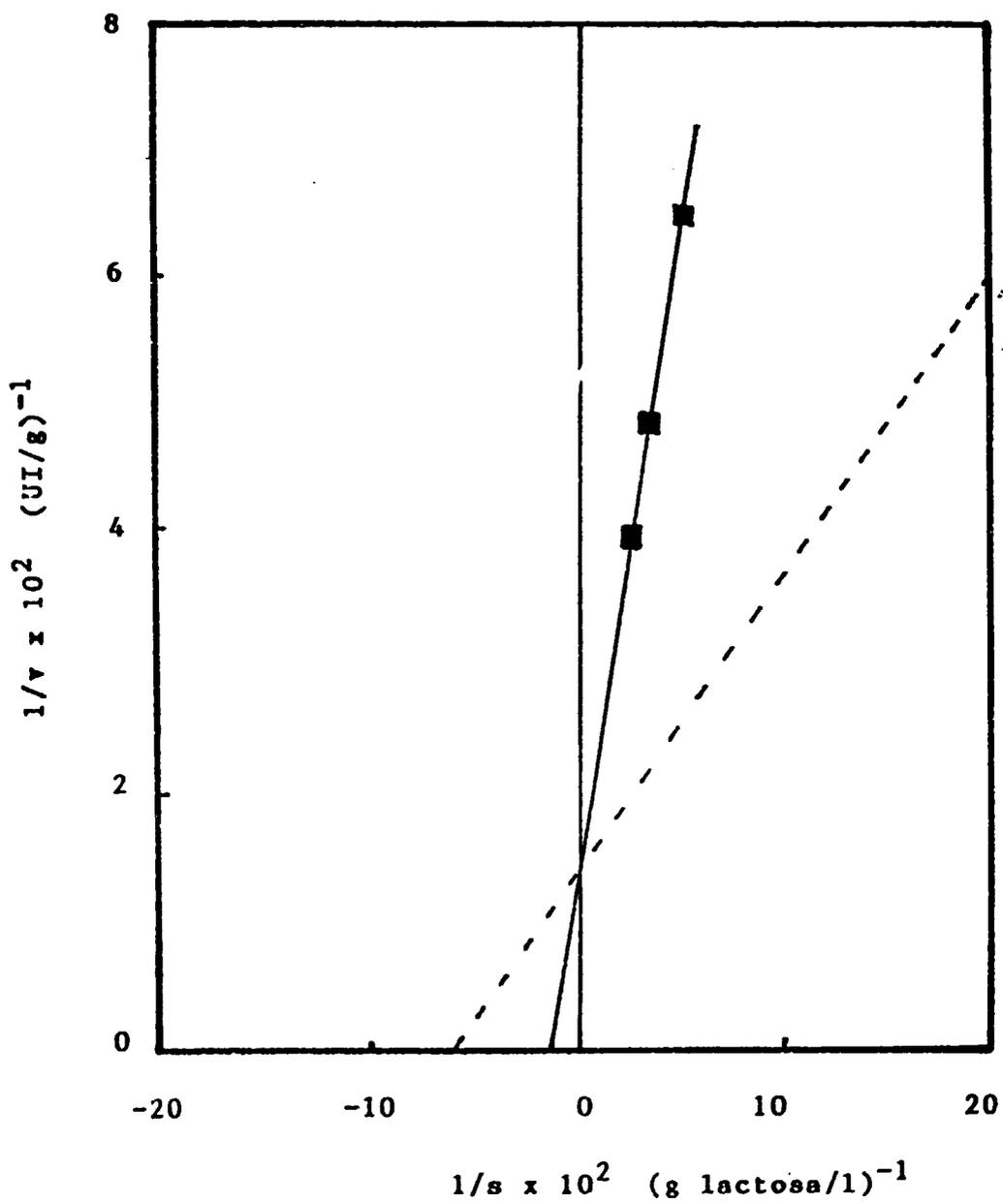


Figura 11: Gráfica para determinar la constante de inhibición por galactosa en la enzima inmovilizada a pH 6.6 y $t = 25^\circ\text{C}$

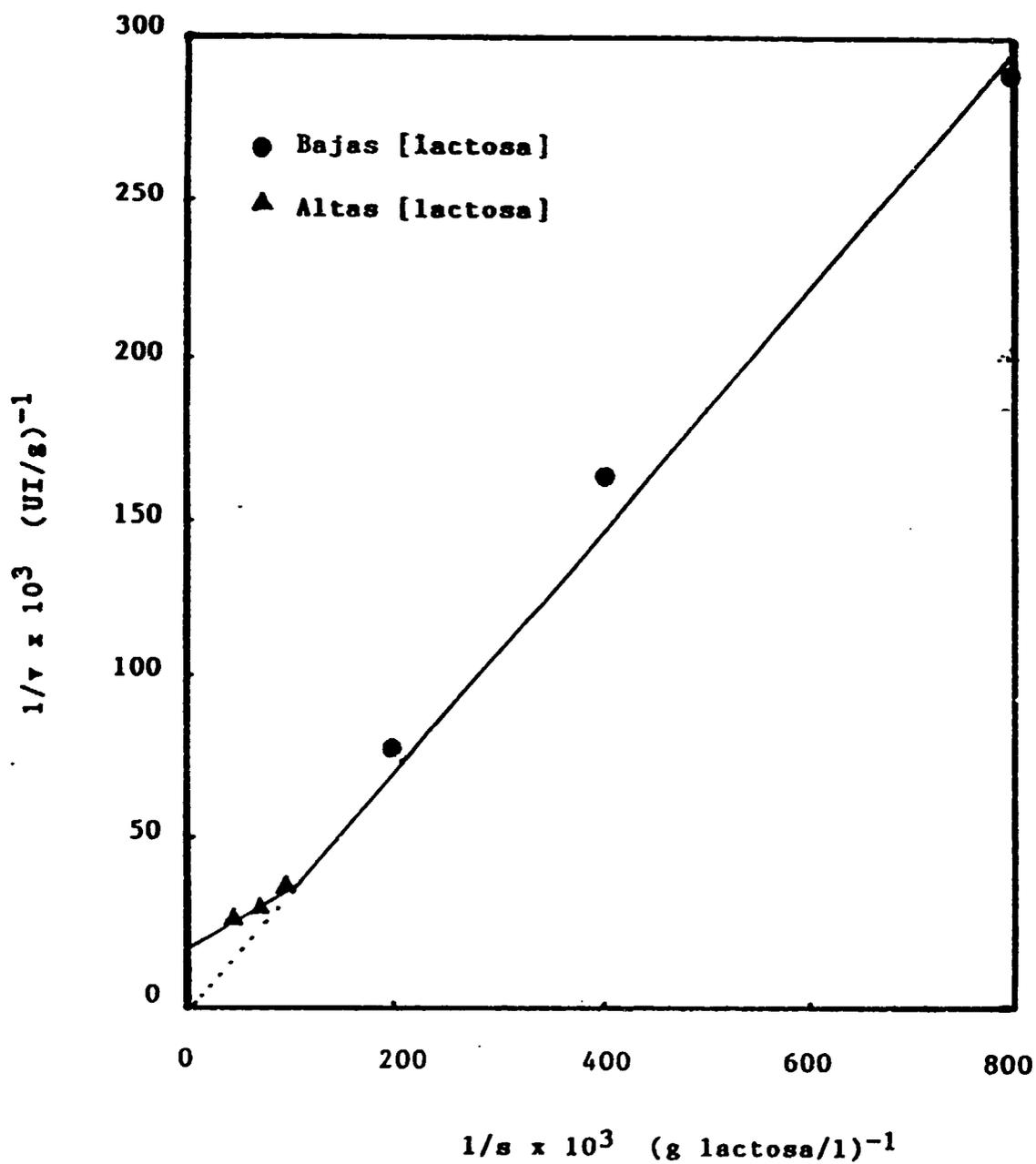


Figura 12: Efecto de las restricciones difusionales externas en el catalizador inmovilizado (pH 6.6 y T = 25°C)

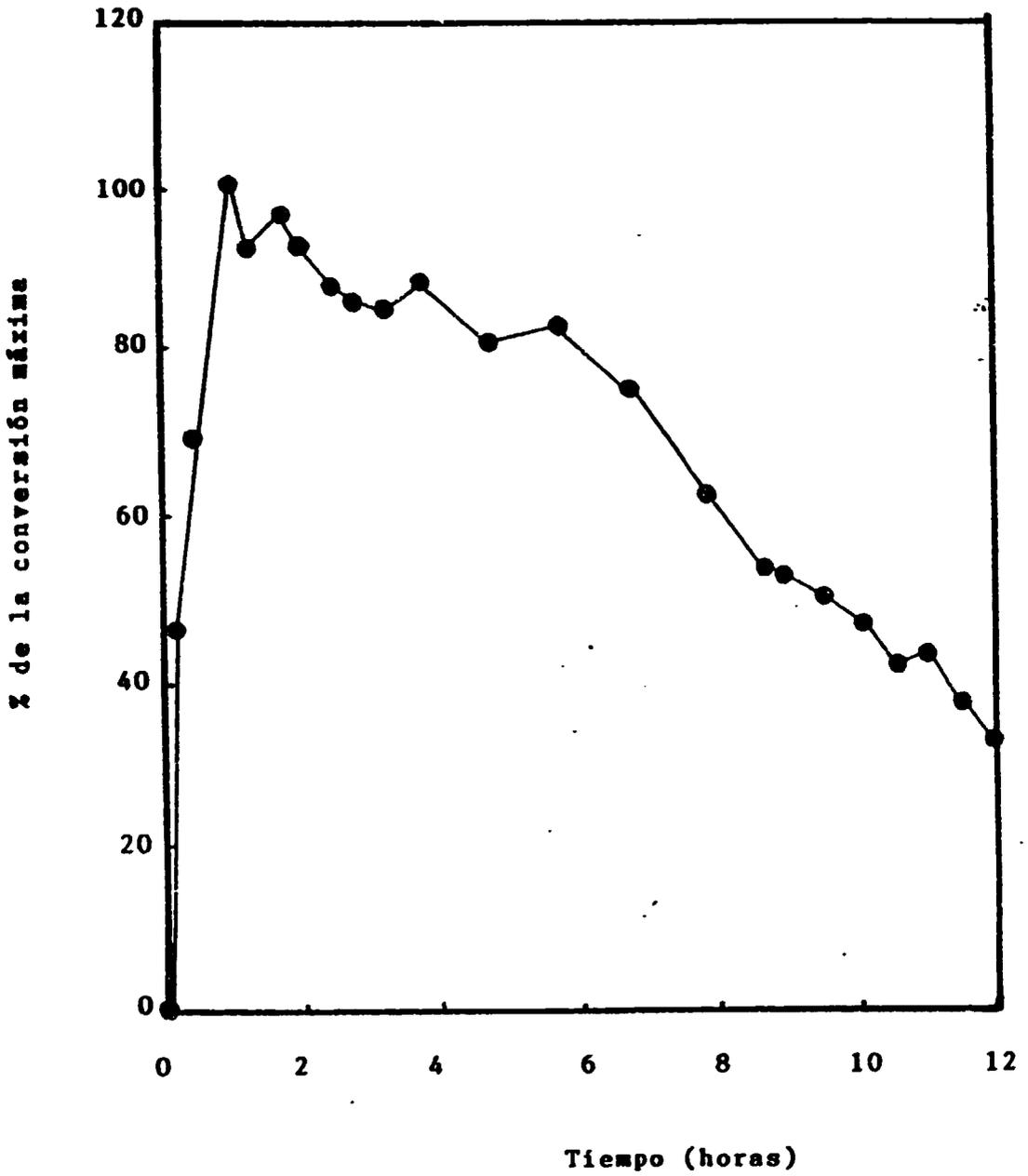


Figura 13: Estabilidad operacional de la lactasa inmovilizada en quitina a 40 °C.

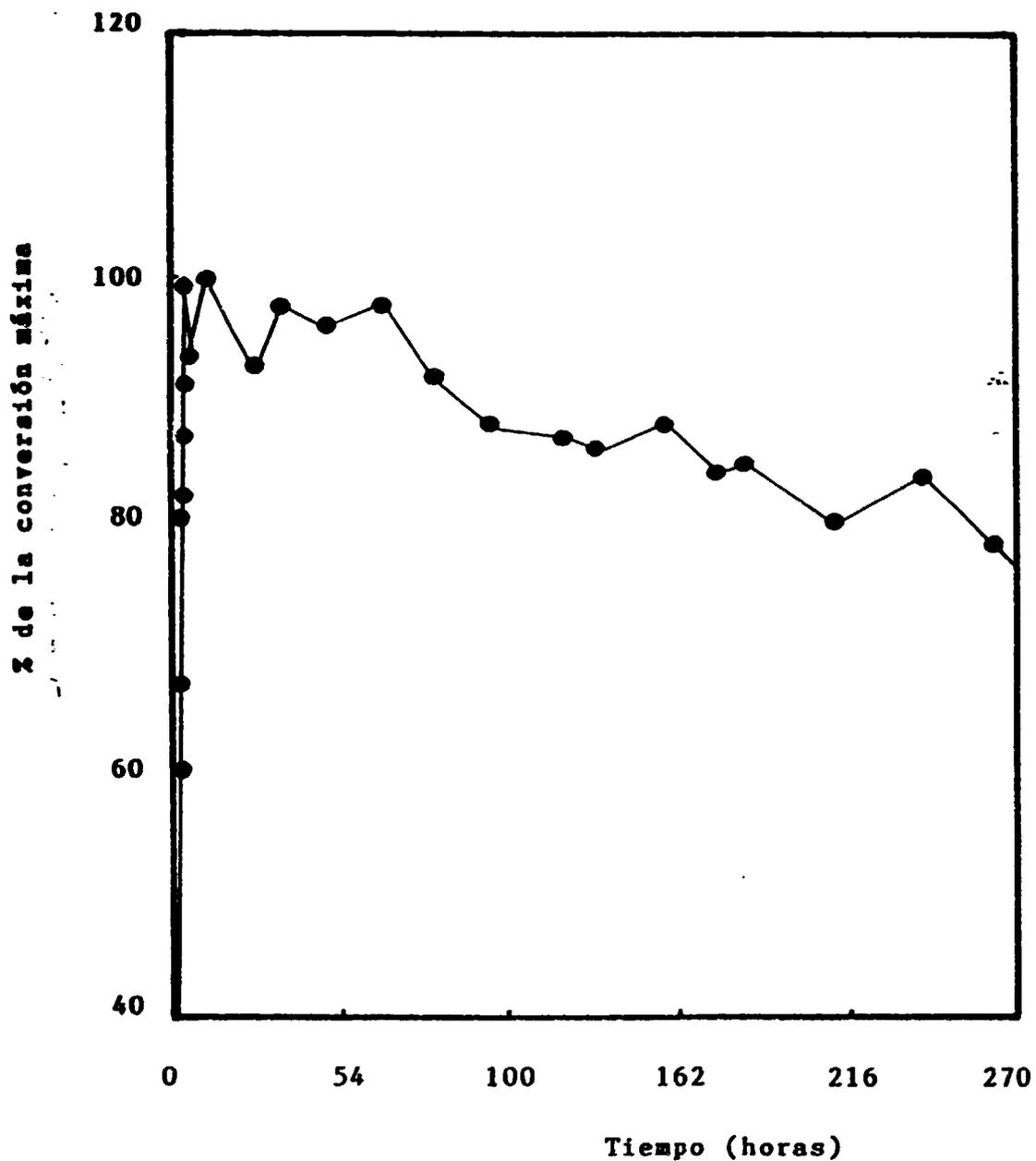


Figura 14: Estabilidad operacional de la lactasa inmovilizada en quitina a 25 °C.

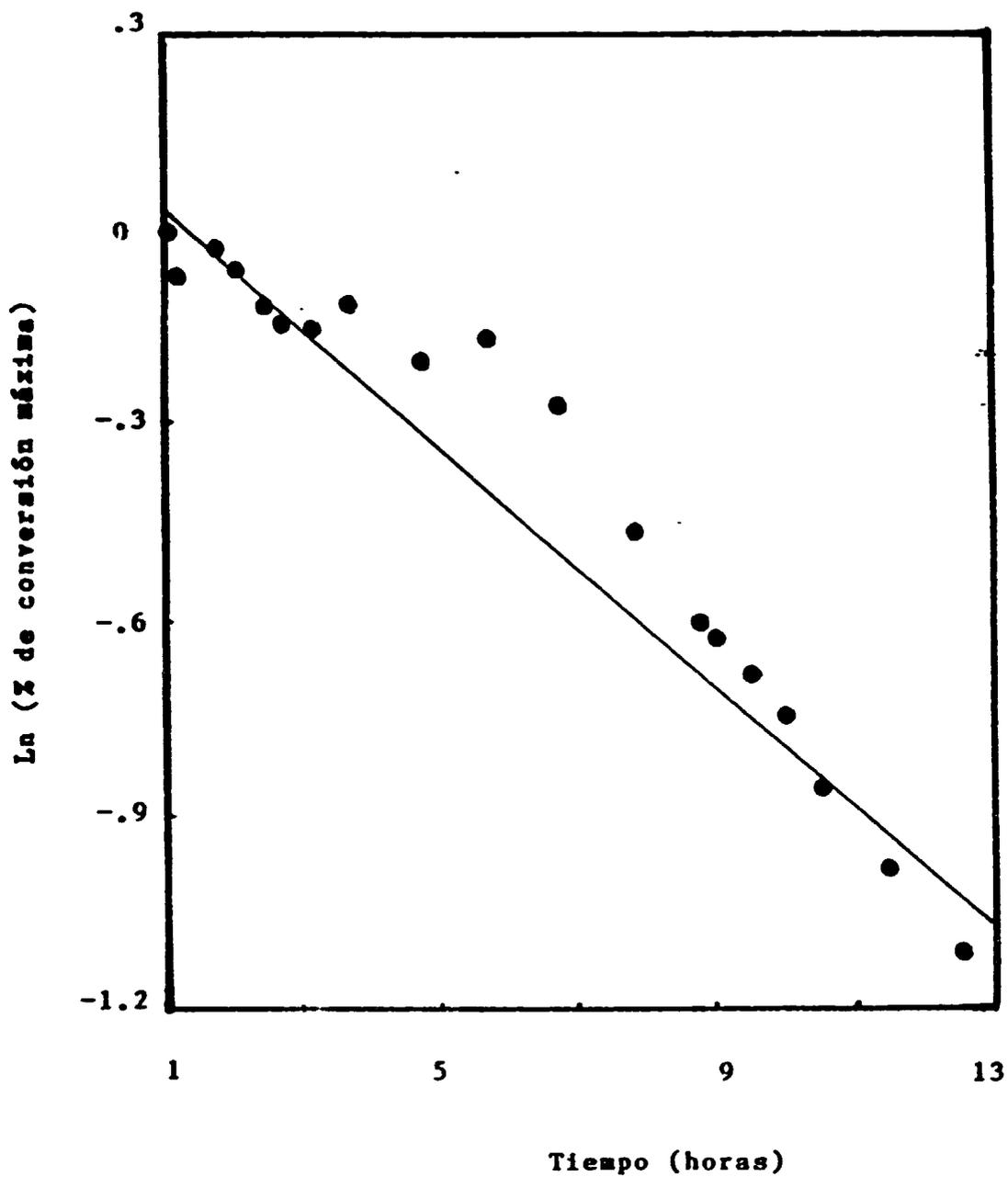


Figura 15: Determinación de la vida media del catalizador enzimático a 40 °C.

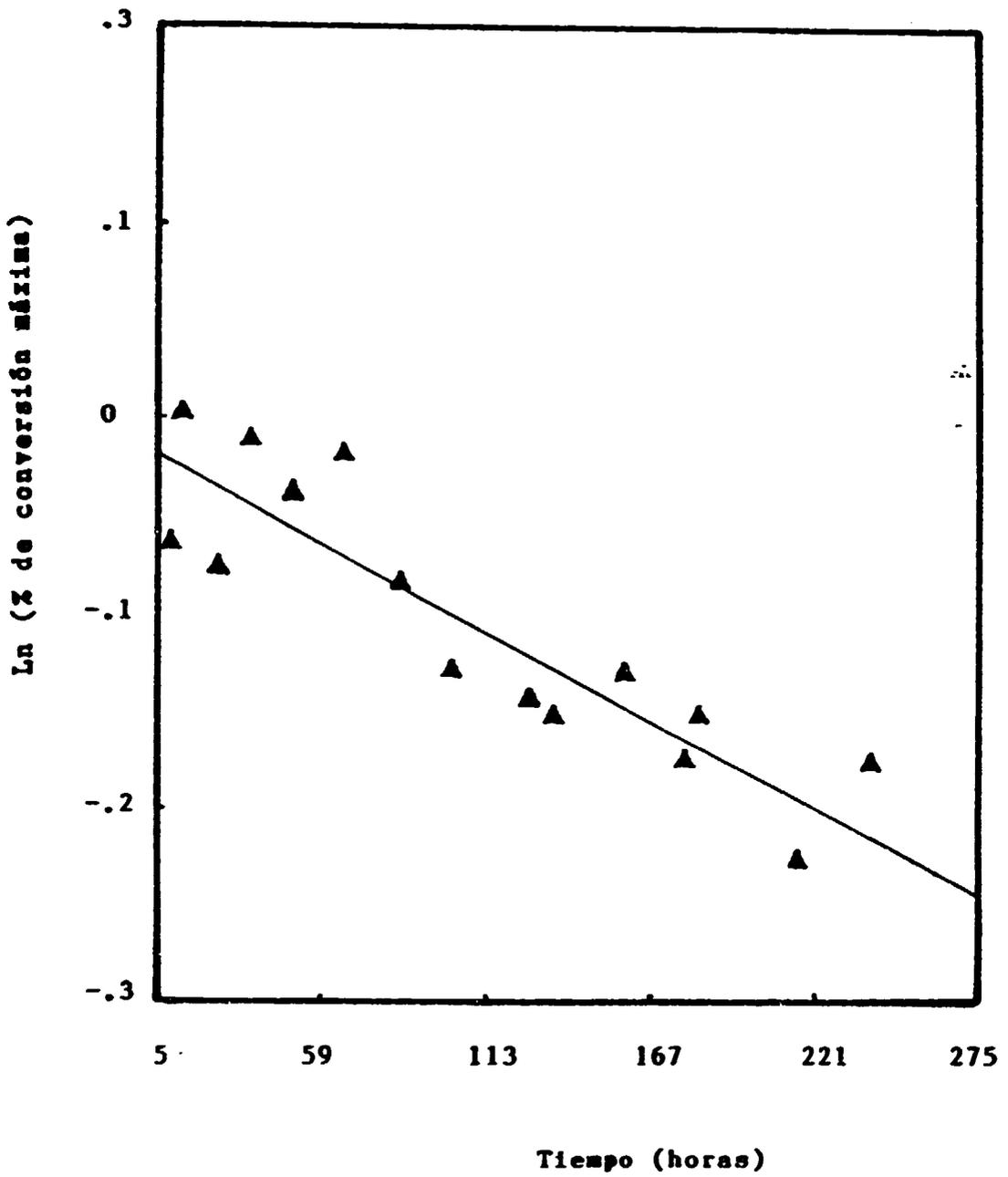


Figura 16: Determinación de la vida media del reactor enzimático a 25 °C.