



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> 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](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at [www.unido.org](http://www.unido.org)

20173

20173  
20173  
20173  
20173

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 EN LECHE Y SUERO

INFORME TECNICO FINAL

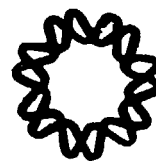
CONTRATO No. 89/087  
Centro de Investigación sobre Ingeniería  
Genética y Biotecnología  
México, D.F.



CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CEINGEBI / UNAM, APDO. POSTAL 510-3, CUERNAVACA, MORELOS 62271, MEXICO



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

Programa Regional de Biotecnología para América Latina  
y el Caribe

PNUD/ONUDI

Agosto 1990

## PARTICIPANTES DEL PROYECTO

Responsable, Coordinadora y Asesora del Proyecto Global

M. en C. Lidia T. Casas

Técnicos

M. en C. Alfredo Martínez

QFB. Javier Torres

Biol. Mercedes González

M. en C. Carlos Peña Malacara

Responsable, estudios de la enzima in vivo

Dr. Jorge Luis Rosado

Agradecimientos: Al M. en C. Leopoldo Güereca por su asesoría en el proceso de escalamiento de la purificación de la enzima.

## Indice

Servicios requeridos del contratista.....	1
Calendario de actividades.....	4
Estudio de la producción de la lactasa en un sistema alimentado.....	5
Caracterización bioquímica de la enzima.....	18
Escalamiento del proceso de purificación de la lactasa.....	30
Manufactura y aplicación de un reactor de un biocatalizador con células - inmovilizadas. Reactores enzimáticos.....	44

**SERVICIOS REQUERIDOS DEL CONTRATISTA (THE SCOPE OF CONTRACTING SERVICES)**

**A. Firma del contrato.**

**B. Producción de la enzima por fermentación.**

**B.1 Estudio más a fondo de la fermentación en 100 litros.**  
Determinación de  $K_{La}$ , niveles de oxígeno disuelto, consumo de azúcares en fermentación de la actividad específica y biomasa.

**B.2 Estudio de fermentación en un sistema alimentado.** A nivel de 14 litros, evaluando represión catabólica y producción de biomasa, variando políticas de alimentación, aereación y agitación del medio de cultivo.

**C. Purificación de la enzima en un sistema líquido-líquido.**

**C.1 Evaluación del costo de producción del proceso de purificación establecido a nivel laboratorio y su comparación con otro proceso de purificación de lactasa de K. fragilis establecido.** En base al estudio económico planteamiento del escalamiento en términos de escala y equipo.

**C.2 Escalamientos del proceso de purificación en base al coeficiente de partición y al estudio económico.**

**D. Caracterización bioquímica de la enzima in vitro e in vivo**

**D.1 Selección de la muestra a analizar (pacientes intolerantes)**

**D.2 Dosificación de la enzima a pacientes intolerantes y establecimiento de la cinética in vivo de la intolerancia, evaluación clínica de los pacientes.**

**D.3 Evaluación de pH y temperaturas óptimas, parámetros cinéticos de la enzima purificada.**

**E. Formulación del producto. Pruebas de estabilidad de almacenamiento de la enzima purificada en la formulación establecida para el extracto enzimático.**

**F. Manufactura y aplicación de un biocatalizador con células inmovilizadas.**

**F.1 Establecimiento de relación biocatalizador-sustrato en términos de conversión, y tiempos de conversión (70%, y 1.30 hrs).**

**F.2 Establecimiento de la ecuación de velocidad del biocatalizador**

**F.3 Reactores enzimáticos, diseño, estabilidad operacional, políticas de saneamiento, conversión.**

**G. Realización de informes.**

H. Producción y distribución de extracto enzimático.

I. Entrenamiento de personal mexicano en Cuba.

J. Entrenamiento de personal colombiano y chileno en México.



∴ CALENDARIO DE ACTIVIDADES (GENERAL TIME SCHEDULE)

ACTIVIDAD	MESES												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	X												
B.1		X	X	X	X	X							
B.2							X	X	X	X	X	X	X
C.1			X	X	X	X							
C.2							X	X	X	X	X	X	X
D.1\		X	X										
D.2				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
D.3				X	X	X							
E.			X	X	X	X	X	X	X	X	X		
F.1		X	X	X	X	X							
F.2								X	X	X	X	X	X
G.							X					X	
H.			X								X		
I.					X	X	X	X	X	X	X	X	X
J.					X	X	X						

## Estudio de la producción de la lactasa en un sistema alimentado.

### Resumen

El objetivo de los estudios presentes es el de mostrar si existe alguna relación entre la velocidad específica de consumo de azúcares ( $q_s$ ) y la actividad específica de la lactasa en células de *K. fragilis*. Para esto se realizaron procesos en lote alimentado a diferentes  $q_s$  manteniendo el  $q_s$  constante. Los resultados nos muestran que es posible el incremento en la actividad específica durante el proceso tanto a  $q_s$  de 13 como de  $320 \text{ h}^{-1}$  siempre y cuando se mantenga un  $q_s$  cercano a 1. Cuando el  $q_s$  se mantiene alrededor de valores de 2 y 3 la actividad específica permanece constante y disminuye respectivamente.

Por último se compara la obtención de la enzima en las mejores condiciones obtenidas para su producción tanto en cultivo en lote como alimentado.

En un cultivo en lote se obtienen 100,000 unidades más que las obtenidas en un cultivo alimentado sin embargo, el rendimiento por gramo de azúcar es de 720 U/gaz. en el primero y de 1040 U/gaz en el segundo, por lo que el proceso a elegir para la producción de la enzima dependerá de la influencia del costo del azúcar en el costo de producción de la enzima y de la facilidad en la operación y control de los procesos a escalas mayores.

### Introducción

Debido a que la producción de lactasa en levaduras se ve reprimida por catabolito, una de las actividades planteadas en el proyecto fue el estudio de un sistema alimentado, a nivel de 14 litros, evaluando represión catabólica y producción de biomasa, variando políticas de alimentación, aireación y agitación en el medio de cultivo.

En el reporte anterior se informa que al parecer existe una relación entre la velocidad específica de consumo de azúcares por la célula y el cambio en la actividad específica en fermentaciones en lote. Se

informa que cuando la velocidad específica del consumo de azúcares por la célula es mayor a dos la actividad específica tiende a disminuir y que cuando esta velocidad de consumo es cercana a uno, la actividad específica tiende a aumentar.

El objetivo de los presentes estudios es el de comprobar, si la velocidad específica de consumo de azúcares afecta a la actividad específica independientemente de los niveles de oxígeno durante el proceso.

### **Materiales y Métodos**

**Determinación de actividad específica y biomasa.** Se realizaron como se informa en los reportes anteriores.

La composición del medio a base de suero y el denominado químicamente definido. Es la que se reporta en el informe presentado en septiembre de 1988.

**Procesos en lote alimentado.** Se realizaron en un medio a base de suero. Se alimentó con una solución de suero al 33.3% con un flujo que osciló entre 0.8 a 5.5 ml/min.

Velocidad específica de consumo de azúcares, se define como:

$$Q_s = \frac{ds}{dx} \frac{1}{dt}$$

$$ds = S_n = S_{n-1}$$

$$dx = \frac{X_n + X_{n-1}}{2}$$

$$dt = 1 \text{ hora}$$

## Resultados

### Velocidad específica del consumo de azúcar y actividad específica de la lactasa.

Los principales efectores en el control de la producción de la  $\beta$ -galactosidasa reconocidos hasta ahora son la lactosa, la galactosa y la glucosa, esto significa que la producción de la enzima dependerá de la concentración de éstos y de la afinidad que tengan por las moléculas "blanco" para formar complejos tales como inductor-represor. La concentración de los efectores en la célula, depende del balance entre la velocidad de entrada a la célula y la velocidad con la que ésta los utiliza. En la figura 1 se muestra la velocidad específica de consumo de azúcares ( $q_s$ ) y la actividad específica a través de la fermentación, en procesos en lote a klas de 13.3, 136 y 320.

En esta figura se observa que en los tres procesos, cuando la velocidad específica de consumo de azúcares es mayor a 2 la actividad específica tiende a disminuir, mientras que cuando este consumo es menor o cercano a uno ésta tiende a aumentar. Los valores de consumo mayores a dos se obtienen al inicio de la fermentación mientras que al final de la fermentación, estos disminuyen. Al parecer mientras más pronto se alcancen valores de consumo de azúcares alrededor de uno en el proceso, la enzima empezará a producirse, y de esto dependerá que al final de la fermentación se obtengan valores de actividad específica similares al inóculo, que consiste en células de levadura totalmente inducidas.

### Fermentaciones en lote alimentado.

Con el objeto de aclarar si la velocidad de consumo específico de azúcares, es la que determina la actividad específica, independientemente de la velocidad de transferencia de oxígeno en el medio y del estado metabólico de la célula; se realizaron fermentaciones en lote alimentados a diferentes klas, tratando de mantener constante la velocidad específica de consumo de azúcares.

En la figura 2 se muestra la actividad específica durante un proceso

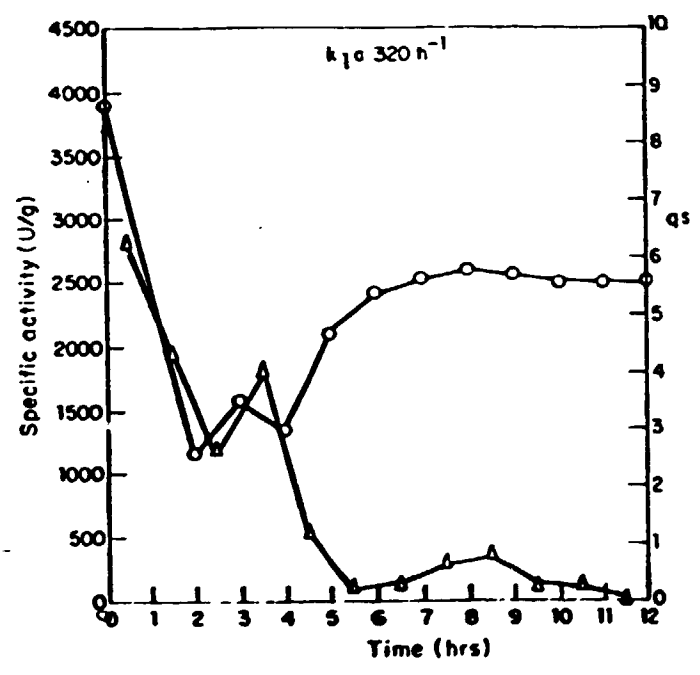
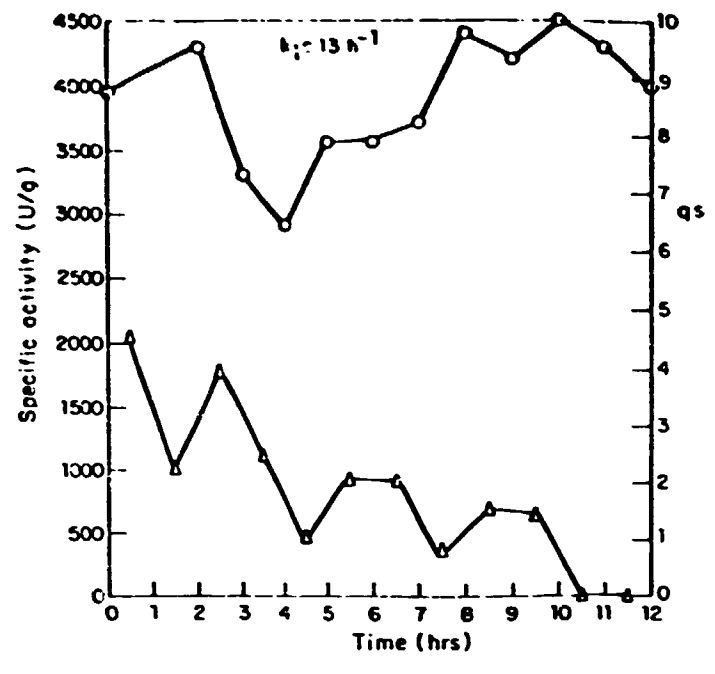
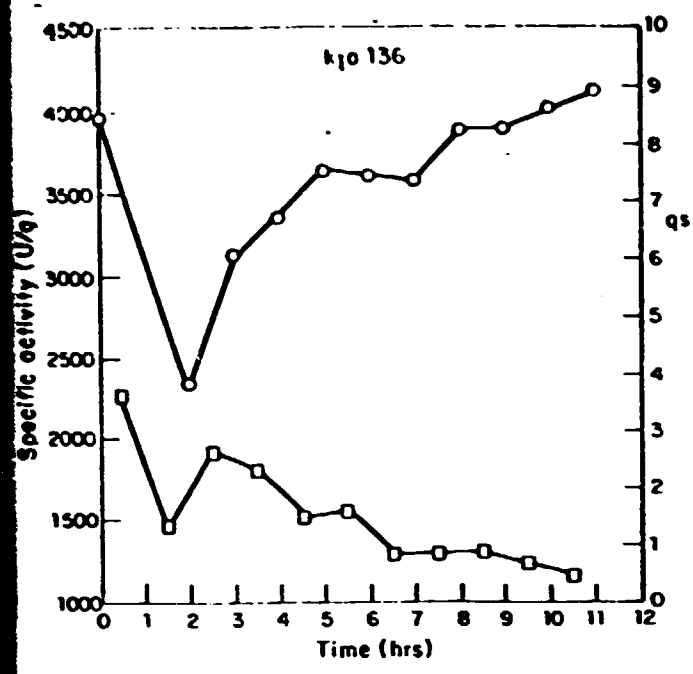


Figura 1. Perfil de actividad específica vs qs en fermentaciones - en lote a diferentes  $K_{10}$ . qs  $\square$ , actividad específica  $\circ$ .

en lote alimentado a un  $k_{la}$  de 320, manteniendo una velocidad específica de consumo de azúcares ( $q_s$ ) cercano a 1.

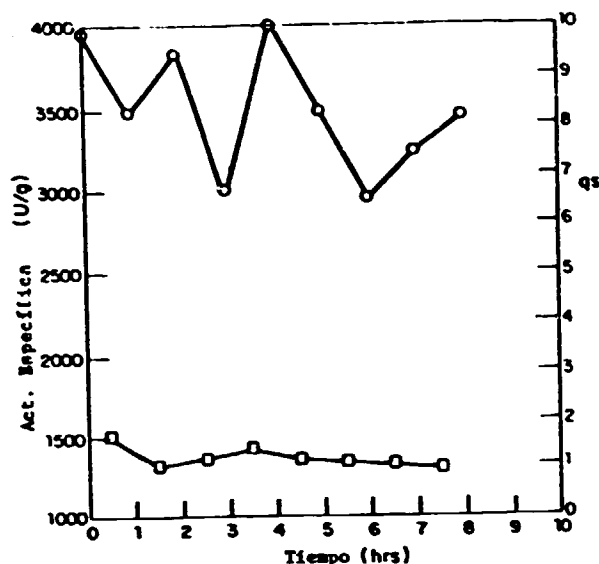


Figura 2. Perfil de actividad específica en un proceso en lote alimentado manteniendo un  $q_s$  cercano a 1 a un  $k_{la}$  de 320  $h^{-1}$ .

En la figura se observa, que la actividad específica oscila entre un valor de 3500 u/g, y no tiende a incrementarse como se esperaba. Este comportamiento puede deberse por un lado, a que no hay una tendencia a que se incremente la actividad específica cuando se tiene  $q_s$  bajos (cerca de 1) en el proceso, o a que el límite superior de actividad específica que se puede obtener con esta cepa es de 4000 u/g. Esta última suposición se basa en dos hechos; primero, que si bien la actividad específica no se incrementó, tampoco disminuyó como se observa en el proceso en lote a un  $k_{la}$  de 320  $h^{-1}$  y segundo a que la actividad específica de esta cepa reportada en la literatura oscila en este valor (Mahoney, 1975).

Con el objeto de proseguir con los estudios de la relación entre la producción de la enzima y la velocidad específica de consumo de azúcares. Se asumió que el límite superior de actividad específica de la célula es de 4000 u/g; por lo que algunos de los experimentos siguientes se realizaron con células sin inducir.

Con el objeto de verificar si es posible el incremento de la actividad específica durante un proceso, manteniendo valores de  $q_s$  bajos (cercaos a 1) independientemente de la velocidad de transferencia de oxígeno y del estado metabólico de la cepa; se realizaron fermentaciones en lote alimentado de  $k_{La}$  de 320 y  $13.3 \text{ h}^{-1}$  manteniendo un  $q_s$  cercano a 1 los valores de actividad específica que se presentan son los que se obtienen a partir de que se obtiene el valor de  $q_s$  deseado. En la figura 3 se muestran los resultados.

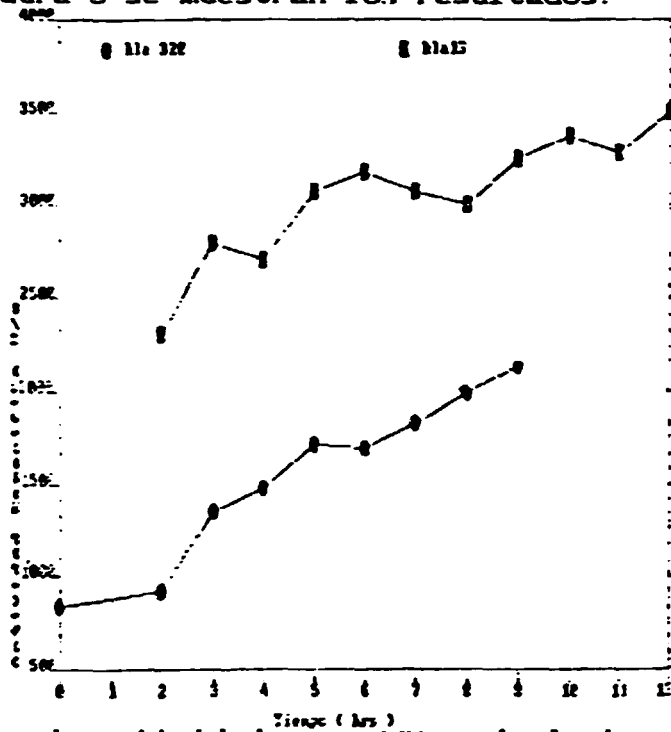


Figura 3. Perfiles de actividad específica de lactasa en procesos en lote alimentado variando la velocidad de transferencia de oxígeno y manteniendo la velocidad específica de consumo de azúcares.

Se observa que en ambos procesos la actividad específica tiende a incrementarse; en los dos procesos el incremento en actividad específica con respecto a la inicial es de 1200 u/g. Estos experimentos muestran que es posible un incremento en la actividad específica en un proceso; independientemente de la velocidad de transferencia de oxígeno en el proceso.

Con el objeto de observar el perfil de actividad específica en un proceso en lote alimentado, manteniendo valores de  $q_s$  mayores a 1, se realizaron fermentaciones, tratando de mantener constantes valores de  $q_s$  cercanos a 2 y 3 a  $k_{La}$  de  $13.3$  y  $133 \text{ h}^{-1}$  respectivamente. En la

figura 4 se muestran los resultados.

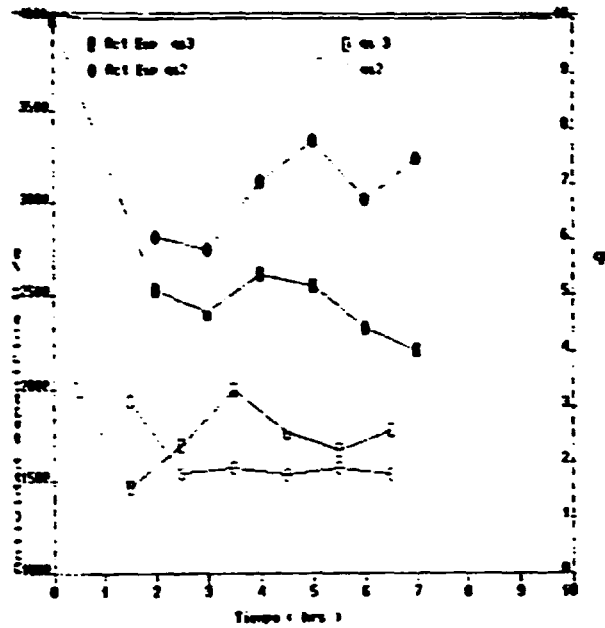


Figura 4. Perfil de actividad específica en procesos en lote alimentado, manteniendo valores de  $q_s$  de 2 y 3.

Se observa que en un valor de  $q_s$  cercano a dos la actividad específica se incrementa un poco pero tiende a permanecer constante, mientras que a valores de  $q_s$  cercanos a tres la actividad específica tiende a disminuir.

En la tabla 1 se resumen: los rendimientos en biomasa y etanol, así como la variación en la actividad específica obtenidos al final de las fermentaciones en lote alimentado, a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno, manteniendo constante la velocidad específica de consumo de azúcares.

Tabla 1. Características de las fermentaciones en lote alimentado a diferentes  $q_s$ .

Proceso	$q_s$ $\left[ \frac{g \text{ Az}}{g \text{ cel}} \times h^{-1} \right]$	$K_L a$ ( $h^{-1}$ )	Act Esp. ( $u/g$ ) [inic. final]	$Y_x$ $\left[ \frac{g \text{ cel}}{g \text{ gaz}} \right]$	$Y_{et-OH}$ $\left[ \frac{g \text{ et-OH}}{g \text{ gaz}} \right]$
A	1	320	800 2000	0.25	0.12
B	1	13	2300 3500	0.13	0.22
C	2	13	2800 3200	0.135	0.2
D	$\approx 3$	135	4000 2340	0.5	0.14



Se observa que la variación en la actividad específica, depende de la velocidad específica de consumo de azúcares, independientemente de la velocidad de transferencia de oxígeno y del estado metabólico de la célula. Así tenemos que en los procesos A y B, en donde se mantuvo un valor de  $q_s$  bajo hay el mismo incremento en la actividad específica, a pesar de tener velocidades de transferencia de oxígeno altas y bajas, con estados metabólicos diferentes (mayor rendimiento en biomasa en A y mayor rendimiento en etanol en B) por otro lado en los procesos B y C en donde se tiene una velocidad de transferencia de oxígeno similar con un estado metabólico similar, el incremento en la actividad específica es de 800 u/g mayor en el proceso B en donde se mantuvo un  $q_s$  cercano a 1.

Al final del proceso D se obtiene una disminución importante de la actividad específica, a diferencia de lo que se obtiene en el proceso en lote a este mismo  $kl_a$ ; también podemos observar que los casos D y A presentan características metabólicas similares, por lo que al parecer lo que determina la disminución de la actividad específica al final del proceso D es la velocidad específica de consumo de azúcares, que en este caso fué mayor a 2.

#### Regulación negativa vs positiva.

Como se mencionó anteriormente, la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa o lactasa en levaduras está regulada a través de una regulación negativa por el operón de lac, en donde la galactosa y la lactosa han sido identificados como inductores y por una regulación positiva o por catabolito por glucosa. La lactosa es hidrolizada en el interior de la célula en sus monosacáridos glucosa y galactosa, por lo que la producción de la enzima se puede ver afectada por los fenómenos de inducción y represión catabólica en forma simultánea. Trabajos de Hewitt, G.M. 1984, han postulado que el fenómeno de represión catabólica se observa cuando hay un exceso de azúcares (glucosa) en el medio, y que una forma de eliminar esta situación es el cultivo en lote alimentado, ya que al incrementarse el volumen se diluyen los azúcares.

La explicación y la relación entre una baja actividad específica y

altas velocidades específicas de consumo de azúcares pudiera ser el resultado de una represión por catabolito al liberarse la glucosa al interior de la célula; sin embargo como también ya se mencionó, la velocidad específica del consumo de azúcar por la célula, refleja un balance entre lo que entra en la célula y lo que utiliza, por lo que otro fenómeno que explique la baja actividad específica vs altas velocidades específicas de consumo de azúcares es la disminución en la inducción, lo que querría decir que a altas velocidades de consumo de azúcar la célula utiliza estos más rápidamente, de tal forma que no hay una total inducción, disminuyendo la actividad específica de la enzima.

Con el objeto de observar si a altas velocidades específicas de consumo de azúcares hay una disminución en la inducción; se procedió a cultivar las células de *K. fragilis* a bajas y altas velocidades de transferencia de oxígeno en un medio químicamente definido utilizando galactosa como inductor y única fuente de carbono. Trabajos realizados por Dickson, han mostrado que la galactosa induce la producción de la  $\beta$ -galactosidasa en levaduras, esta inducción es similar a la lactosa ya que en concentraciones equivalentes se obtienen los mismos niveles de inducción, por otro lado, estos mismos estudios sugieren que al igual que en el operón de lac, *E. coli* la lactosa por sí sola no induce sino el producto de la actividad de la lactasa sobre la lactosa.

En la figura 5 se muestran los perfiles de actividad específica de lactasa obtenidos en un cultivo en lote, con bajas velocidades de transferencia de oxígeno, utilizando diferentes concentraciones de galactosa como única fuente de carbono y energía.

En la figura se observa que efectivamente la galactosa induce la síntesis de la lactasa y como cualquier inductor la actividad específica aumenta al aumentar la concentración de éste. En este experimento se midió el  $q_s$  para cada concentración de galactosa, obteniéndose valores de  $q_s$  menores a 2.

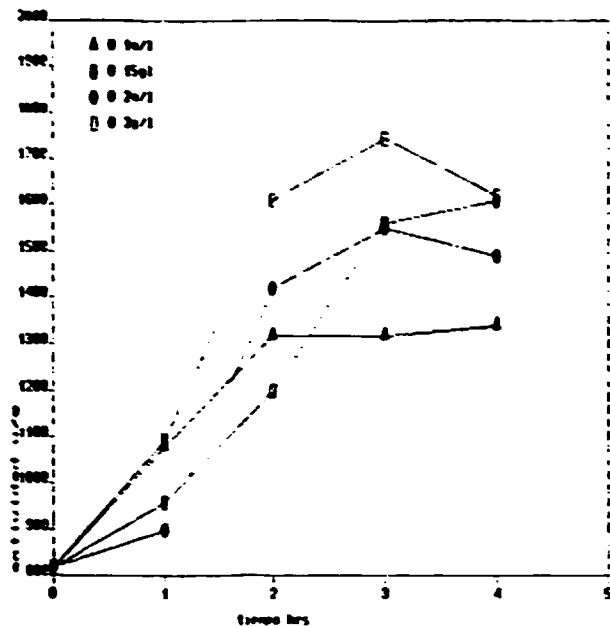


Figura 5. Perfil de actividad específica de lactasa obtenidos cultivando las células de *K. fragilis* en bajas velocidades de transferencia de oxígeno con galactosa como fuente de carbono.

En la figura 6 se presentan la comparación en perfil de actividad específica en un cultivo con altos niveles de transferencia de oxígeno, utilizando galactosa y lactosa como inductores y fuente de carbono y energía.

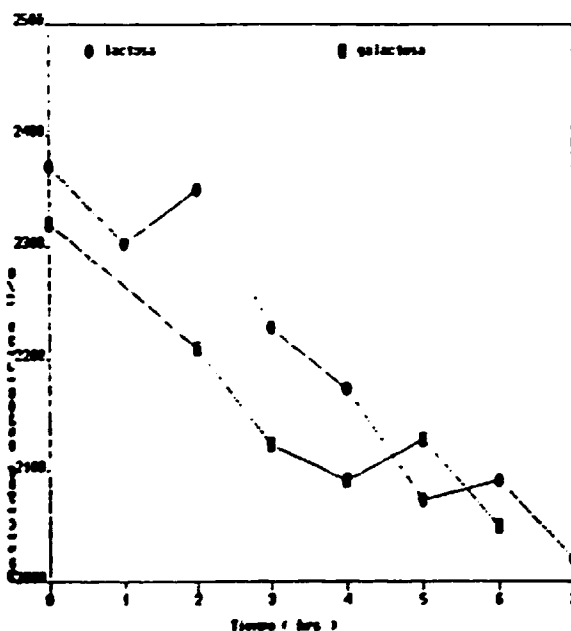


Figura 6. Perfil de actividad específica de lactasa obtenidos cultivando las células de *K. fragilis* en altas velocidades de transferencia de oxígeno con galactosa como fuente de carbono.

En la figura 6 se observa que la actividad específica disminuye aún en presencia de galactosa, se midieron los  $q_s$ , y en ambos casos los valores encontrados fueron de 2 mayores. *mejor*

Estos resultados sugieren que la disminución en la inducción puede estar relacionada con altos  $q_s$  y que éste fenómeno es tan o más importante que la posible represión catabólica, provocada por la presencia de glucosa una vez hidrolizada la lactosa en el interior de la célula.

### Discusión y Conclusión

Los estudios realizados sugieren que la relación entre la producción de la  $\beta$ -galactosidasa en células de *K. fragilis* y la velocidad de transferencia de oxígeno es alterando la relación de los azúcares, lactosa, glucosa y galactosa en el interior de la célula, a través del aumento o disminución de su consumo durante el proceso.

La relación de los azúcares al interior de la célula parece afectar más la regulación negativa (inducción por lactosa y galactosa) que la regulación positiva (regulación por catabolito); ya que a altas velocidades de transferencia de oxígeno con  $q_s$  mayores a dos la actividad específica disminuye aún cuando la célula es crecida en ausencia de represor (glucosa) y en presencia de inductor (galactosa). Este fenómeno se puede explicar como el compromiso que tienen estas moléculas entre actuar como efectores y fuentes de carbono y energía.

Este comportamiento puede explicar la relación del oxígeno con la producción de otras proteínas como la penicilino acilasa en células de *E. coli* (L. Casas, 1981) y la proteína híbrida cadena b- de insulina- $\beta$ -galactosidasa en células de *E. coli* (E. Galindo, 1980). En el primer caso el ácido fenilacético se utiliza, como fuente de carbono e inductor y en el segundo caso la lactosa desempeña el mismo papel. En ambos casos a altas OTR en el proceso menor es la actividad específica. Así este fenómeno deberá de ser considerado para la producción de proteínas en donde moléculas inductoras también sean utilizadas como fuente de carbono y en la estrategia para la elección de promotores cuando se desea sobre expresar una proteína por técnicas

de ingeniería genética.

Por último, uno de los objetivos del proyecto es el de comparar el cultivo en lote con el cultivo en lote alimentado. En la tabla 2 se presenta una comparación entre los procesos en lote y en lote alimentado en donde se obtiene una mayor producción de enzima.

Tabla 2. Producción de lactasa en células de *K. fragilis* cultivadas en un cultivo en lote y un cultivo alimentado.

Tipo de cultivo	U totales	U/g azúcar	Act Esp. (U/g)	Biomasa (g células)
En lote	<del>360 000</del>	720	<del>4000</del>	90
En lote alimentado	<del>264 830</del>	1040	3450	<del>70.8</del>

Escala de 10 lts.

En la tabla se observa que el rendimiento de enzima por gramo de azúcar utilizado es mayor en el cultivo alimentado, sin embargo se obtienen <sup>70.000</sup> ~~100 000~~ unidades más en un cultivo en lote que en un cultivo alimentado, debido a que en el primero se obtiene mayor biomasa. Estos resultados nos indican que el proceso a elegir, dependerá de la influencia del costo de la fuente de carbono en el costo de la producción de la enzima y de la facilidad en la operación y control de cada uno de los procesos en escalas mayores.

#### Referencias

1. Casas T L, (1981) Producción del ácido 6-APA por hidrólisis enzimática de la penicilina G. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México.
2. Dickson R C, Markin J S, (1980) Physiological studies of  $\beta$ -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. J. Bacteriol. Genetics 142: 777-785.

3. Dickson R C, Sheetz R M, (1981) LAC4 is the structural gene for  $\beta$ -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. J. Bacteriology. Genetics 98: 729-745.
4. Galindo E, Bolivar F, Quintero R, (1990) Maximizing the expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* by manipulation of culture conditions. J. Ferment and Bioeng. 69 (3): 1-6.
5. Hewitt G M and Grootwassink J W, (1984) Yeast  $\beta$ -galactosidase production and application. Enzyme Microb. Technol. 6: 263.
6. Mahoney R R, Nickerson T A, Whitaker J R, (1983) Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. J. Dairy Sci. 58 (11): 1620-1629.

## Caracterización bioquímica de la enzima

### Resumen

En esta sección se presentan los estudios de estabilidad de anaquel de la enzima purificada y la actividad del extracto enzimático in vivo.

La enzima purificada formulada en condiciones estériles, en glicerol con sales de fosfato, magnesio y manganeso a 4°C mantiene el 65% de su actividad inicial a los 50 días de almacenamiento.

El extracto enzimático presenta actividad de lactasa in vivo, recomendándose que se realicen estudios de intolerancia con dosis de 2000 mg del producto.

### Introducción

Un aspecto importante en la evaluación de un producto, es su estabilidad en el almacenamiento o vida de anaquel. Es por esto que en el proyecto se ha planteado la evaluación de la enzima lactasa purificada a través de un sistema acuoso de 2 fases.

Para una evaluación completa es importante analizar estabilidad de anaquel de la enzima a diferentes temperaturas en función de su actividad, así como la posible contaminación microbiológica del producto obtenido.

Una segunda evaluación es analizar la actividad de la enzima in vivo, esto significa la capacidad de la enzima para hidrolizar a la lactosa de la leche in vivo; con el objeto de utilizar el producto en la terapia in vivo de pacientes intolerantes a la lactosa.

El objetivo de los estudios presentes es el de evaluar la estabilidad de anaquel de la enzima purificada, formulada en glicerol y sales de fosfato, magnesio y manganeso así como la evaluación del extracto enzimático (células de levadura secas) in vivo.

## Metodología (estabilidad de la enzima en anaquel)

Preparación de la enzima purificada. Se purificó a la lactasa por medio de un sistema acuoso con PEG 400/fosfato y una precipitación con PEG 6000 (4 sistemas de aproximadamente 200 ml). El producto obtenido se almacenó en dos condiciones diferentes. Dos de los precipitados, se resuspendieron en amortiguador de fosfato, 1 M pH 6.6 (lote A y B) y los otros dos se resuspendieron en el mismo amortiguador y se le adicionó glicerol al 50% (lote C y D). Los cuatro lotes se almacenaron a 4°C.

A los 4 lotes de enzima se les determinó actividad enzimática durante 2 y 3 meses respectivamente, con el objeto de evaluar la estabilidad enzimática en el almacenamiento. A los lotes con glicerol (C y D) además se les hizo un estudio microbiológico.

Estudio microbiológico. Dicho estudio consistió en plaquear el producto obtenido en la purificación (previa dilución) en cajas con medio luria para el crecimiento de bacterias y en cajas con medio de extracto de malta para el crecimiento de levaduras. La diferencia entre los lotes fué que el lote D se suspendió en condiciones estériles (amortiguador estéril).

## Resultados

### Estabilidad de la enzima

Almacenamiento de la enzima en amortiguador de fosfato. Los resultados obtenidos para el almacenamiento de la enzima usando únicamente amortiguador de fosfato son mostrados en la figura 1.



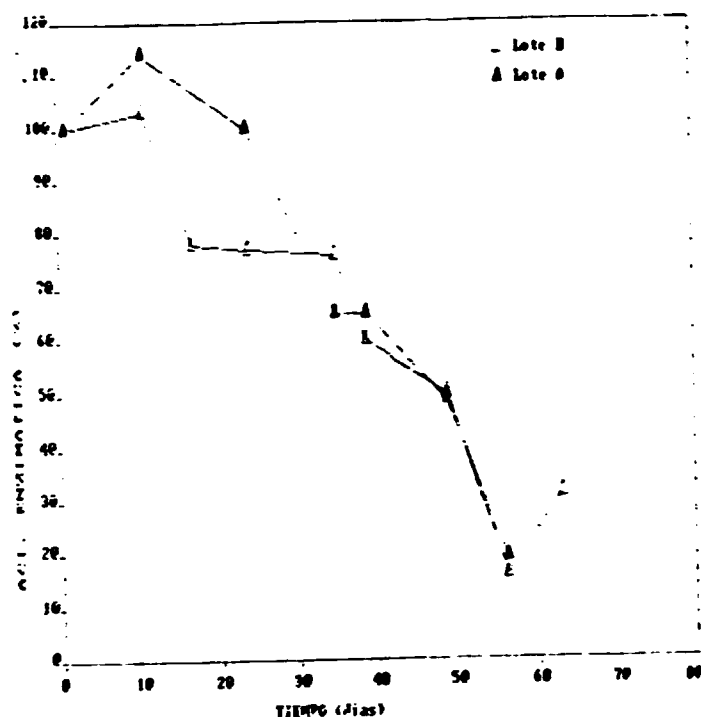
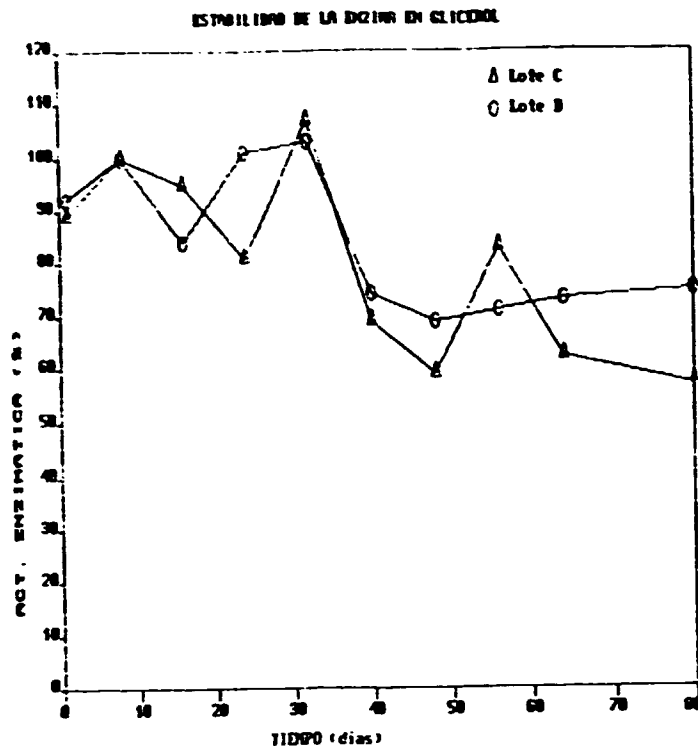


Figura 1. Estabilidad de la enzima, cuando se almacena en amortiguador de fosfato .1M pH 6.6.

En dicha figura se puede observar que el producto conserva su actividad durante los primeros 10 días, después de los cuales la actividad enzimática empieza a decaer hasta que a los 50 días conserva únicamente el 50% de la misma. Por lo tanto se puede concluir que la vida media para la enzima almacenada en amortiguador de fosfatos es de 50 días.

#### Almacenamiento de la enzima en amortiguador de fosfato y glicerol.

Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la figura 2. Estos indican que la enzima es más estable almacenada en estas condiciones, puesto que la actividad enzimática decae más lentamente que la enzima almacenada solo en amortiguador de fosfato.



**Figura 2. Estabilidad de la enzima cuando se almacena en amortiguador de fosfatos .1M pH 6 con glicerol 50%.**

Con este método la actividad enzimática inicial se mantiene hasta los 30 días, después de los cuales la actividad enzimática empieza a decaer. A los 50 días el producto conserva el 65% de actividad.

#### **Estudio microbiológico.**

Los resultados obtenidos del estudio microbiológico son mostrados en las figuras 3 y 4. En la figura 3 se observan los resultados cuando el producto se resuspendió en condiciones no estériles. Se puede observar que hay una alta contaminación microbiológica ( $180 \times 10^4$  microorg/ml) tanto para medio para bacterias como para levaduras. También se observa que la población microbiana baja considerablemente con el transcurso del tiempo, lo cual es favorable para el producto. Esta disminución es la esperada, ya que la actividad de agua en la formulación es muy baja.

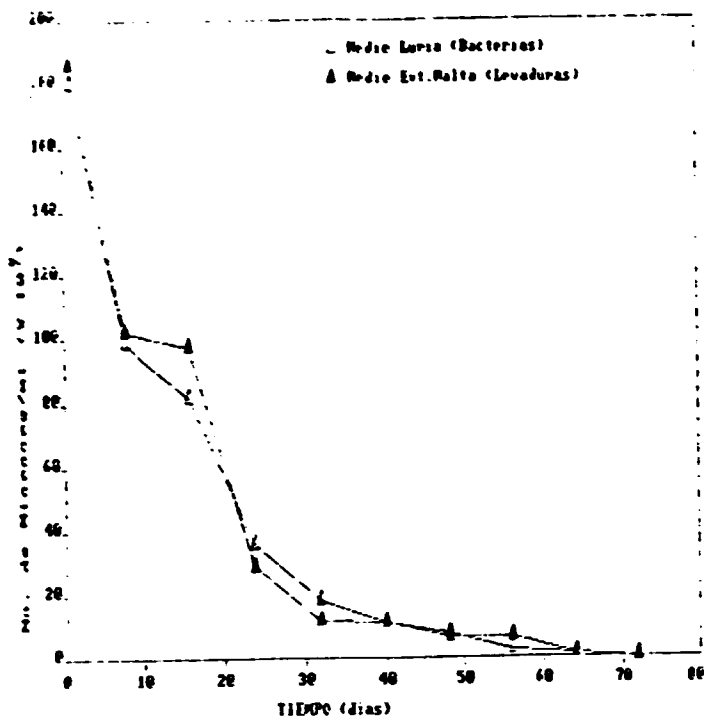


Figura 3. Resultados obtenidos en el estudio microbiológico cuando el producto obtenido de la purificación se resuspendió en condiciones no estériles.  $\Delta$  medio luria.  $\Delta$  medio con extracto de malta.

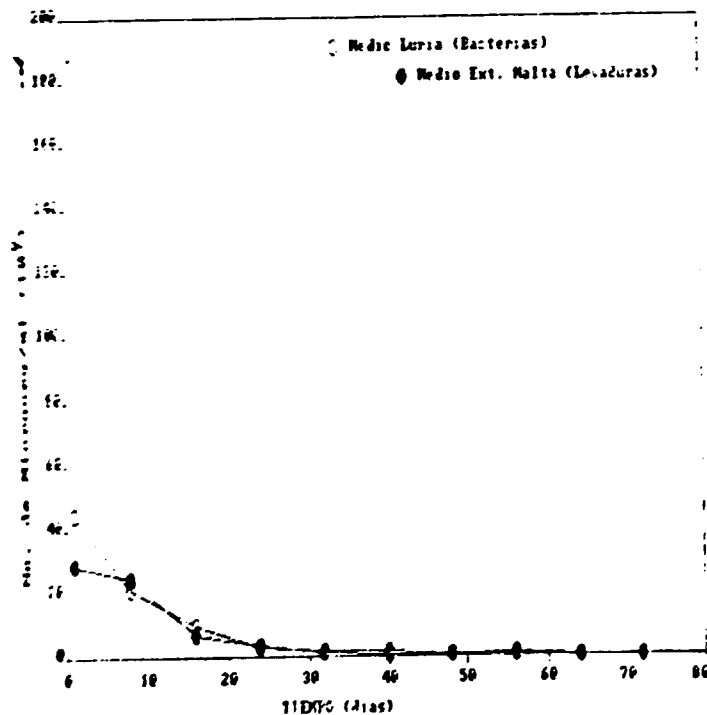


Figura 4. Resultados obtenidos en el estudio microbiológico cuando el producto obtenido de la purificación se resuspendió en condiciones estériles.  $\circ$  medio luria.  $\bullet$  medio con extracto de malta.

La figura 4 nos muestra los resultados cuando el producto se resuspendió en condiciones estériles (cerca del mechero y con amortiguador de fosfatos estéril). La contaminación microbiológica observada en estos experimentos fue menor que cuando se resuspendió en condiciones no estériles, siendo el comportamiento similar tanto para bacterias, como para levaduras. En esta cinética también se observó un decremento en la población microbiana en el transcurso del almacenamiento.

#### Discusión y conclusión

Los estudios nos muestran que la estabilidad de la enzima en la formulación con glicerol es adecuada y que a los 50 días de almacenamiento ésta mantiene alrededor del 65% de su actividad inicial. Con respecto al estudio microbiológico la conclusión sería que es posible aplicar el formulado en forma estéril después de días de almacenamiento. Sin embargo es recomendable tratar de añadir un conservador. Este conservador deberá elegirse en función de la aplicación del producto.

## Metodología (actividad de la enzima in vivo)

**Sujetos.** Se estudiaron 10 sujetos, adultos sanos, en un rango de edad de 22 a 40 años. Del total de sujetos 2 fueron hombres y 8 mujeres; 9 de ellos nacidos en México de padres Mexicanos y uno nacido en el Salvador de padres Salvadoreños. Los sujetos estudiados se seleccionaron de acuerdo con su capacidad de digerir a la lactosa. Para esto se realizó una prueba de tolerancia a la lactosa (tratamiento A), la cual consistió en la administración de 360 ml de leche intacta (Mi leche, Liconsá S.A. de C.V., México) a 19 sujetos; aquellos cuya excreción de hidrógeno en el aire espirado, durante las 5 horas posteriores a la ingestión de la leche, presentó un incremento mayor a 20 ppm, fueron clasificados como individuos malos digestores de lactosa e incluidos en los estudios posteriores. La prueba se realizó de acuerdo a procedimientos reportados previamente (Rosado J. L. 1985, 1987).

**Tratamientos.** Los 10 sujetos que resultaron ser malos digestores de lactosa se estudiaron posteriormente mediante la aplicación de 6 tratamientos diferentes. De estos 5 tratamientos (tratamientos B, C, D, E y F) consistieron en la administración, a cada sujeto, de 360 ml de leche intacta adicionada con dosis graduales de una beta-galactosidasa microbiana (BGM) obtenida de levadura y desarrollada por el CEINGEBI. Los tratamientos fueron los siguientes: B) 360 ml de leche intacta adicionada con 500 mg de BGM, C) 360 ml de leche intacta adicionada con 1000 mg de BGM, D) 360 ml de leche intacta adicionada con 150 mg de BGM, E) 360 ml de leche intacta adicionada con 2000 mg de BGM y F) 360 ml de leche intacta adicionada con 2500 mg de BGM. Como control positivo se incluyó en el análisis la respuesta obtenida en el tratamiento A con leche intacta; finalmente se sometió a todos los sujetos a una séptima prueba (tratamiento G) en la que se administraron 360 ml de leche intacta previamente tratada con una beta-galactosidasa obtenida de *Kluyveromyces lactis*. El tratamiento consistió en la adición de 250 mg de la enzima a 360 ml de leche; pero en este caso se adicionó 24 horas antes de su consumo y se dejó en refrigeración durante este período. Este procedimiento produce una hidrólisis del 90 a 100% de la lactosa inicial (Rosado J. L.,

1988); por lo que se le denomina en este reporte como leche hidrolizada (LH).

Todos los tratamientos fueron administrados en la mañana después de un ayuno de por lo menos 12 horas. El orden de los tratamientos B al G varió en cada uno de los sujetos y se hizo en forma de cuadro latino.

**Digestión de lactosa.** La capacidad de digestión de lactosa con cada uno de los tratamientos se evaluó mediante el análisis de hidrógeno en el aire espirado, posterior a la ingestión de cada tratamiento (Rosado J. L., 1985). Para esto, se tomó una muestra de aire espirado antes de la ingestión del tratamiento respectivo y a intervalos de 30 minutos durante las 5 horas posteriores. Las muestras se tomaron haciendo respirar al sujeto a través de una válvula Hans-Rudolph, la cual estaba unido a una bolsa de hule y esta, a su vez, conectada a una jeringa de plástico de 25 cc.

La muestra de aire espirado obtenida en la jeringa se analizó para conocer la concentración de hidrógeno utilizando un cromatógrafo de gases (Microlyzer M-12, Quintron Inc, WI) de detección electroquímica.

Las evaluaciones con cada uno de los 7 tratamientos se realizaron en ayunas y durante la evaluación de 5 horas los sujetos no ingirieron alimento alguno excepto agua y tampoco se les prometió fumar; las pruebas se realizaron dejando un periodo mínimo de 72 horas entre cada una, con el fin de evitar una disminución en la capacidad individual de producir hidrógeno debido al efecto residual del tratamiento anterior en la flora intestinal (Derman J. A., 1981).

**Tolerancia a la lactosa.** Con cada tratamiento se llevó a cabo un registro de los síntomas clínicos asociados con la tolerancia a los carbohidratos, al terminar cada prueba de 5 horas se pidió a cada sujeto que llenara un cuestionario en el que se preguntaba sobre la presencia de síntomas y su drasticidad observados durante el periodo de estudio. Los síntomas incluidos en el cuestionario fueron: 1) dolor de cabeza, 2) cólico abdominal, 3) flatulencia, 4) dolor de piernas y 5) diarrea. Los síntomas 1 y 4 se incluyeron para distraer la atención del sujeto, mientras que los síntomas 2, 3 y 5 son los que están

asociados con la tolerancia/intolerancia a los carbohidratos y por lo tanto fueron los que se incluyeron en el análisis. Para calificar la drasticidad, se pidió al sujeto que determinara si la presencia del síntoma era "leve", "moderada" o "fuerte".

**Análisis de datos y consideraciones estadísticas.** La capacidad de digestión de lactosa se midió por el incremento máximo en la curva individual de excreción de hidrógeno, obtenida durante las 5 horas de observación. En el presente trabajo se utilizó el criterio convencional de 20 ppm de incremento de para determinar si el sujeto era o no mal digestor de lactosa; esta evaluación se aplicó a todos los tratamientos.

La calificación de síntomas se determinó considerando tanto la presencia como la drasticidad de cada uno de los síntomas evaluados, la presencia de cólico abdominal y flatulencia recibieron una calificación de 1, 2 ó 3 cada uno, dependiendo si se presentaron en forma leve, moderada o fuerte respectivamente; la presencia de diarrea se calificó como 2, 3 ó 6 en el mismo orden. Esto hace una calificación total para evaluar la tolerancia de 0 a 12.

La efectividad de las enzimas estudiadas se evaluó comparando cada una de las variables estudiadas entre los diferentes tratamientos; esta comparación estadística se hizo utilizando la prueba de diferencia mínima de cuadros (Snedecor G.W., 1989).

## Resultados

**Digestión y tolerancia de la lactosa.** El promedio de la excreción de hidrógeno durante las 5 hora de observación en los 10 sujetos estudiados con los 7 diferentes tratamientos se muestra en la figura 1.

La excreción más alta la presenta el tratamiento con la lactosa intacta (tratamiento A); la adición de la enzima en el rango de 500 a 1500 mg causa una disminución ligera en la excreción de hidrógeno, representando hidrólisis de lactosa en el tracto digestivo. La adición de la enzima en el rango de 2000 a 2500 mg disminuye aún más la excreción de hidrógeno; pero aún a estos niveles de enzima la

respuesta es bastante diferente en comparación con el tratamiento con leche libre de lactosa (LHD).

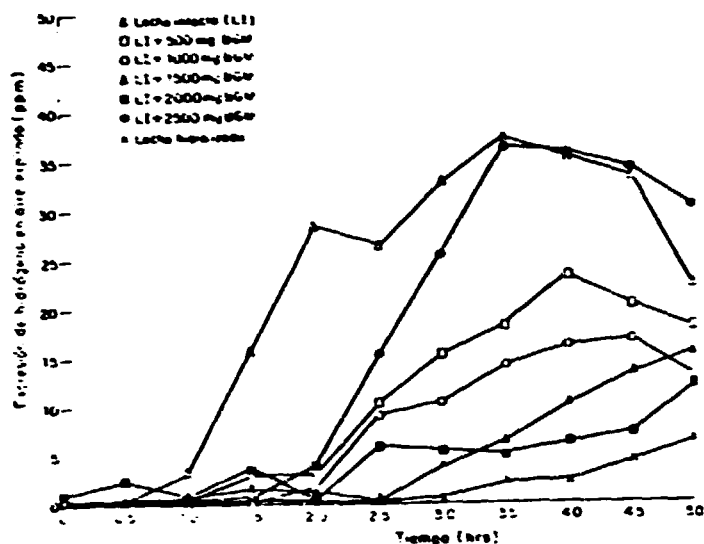


Figura 1. Evaluación de la excreción de hidrógeno en sujetos con diferentes dosis de lactasa.

La tabla 1 resume los resultados obtenidos en cuanto a la digestión de lactosa y tolerancia a cada uno de los tratamientos incluidos en el estudio.

Tabla 1. Excreción de hidrógeno y síntomas presentados por 10 sujetos después de la ingestión de 360 ml de leche intacta (LI), LI adicionada con dosis-graduales de beta-galactosidasa y leche con la lactosa hidrolizada (LHD).

Tratamiento	No. de sujetos max. 20 ppm	Excreción H <sub>2</sub> (ppm)	Calificación de síntomas
Leche intacta (LI) A	10/10 (100%)	50.8 ± 6.6	0.8 ± 0.4
LI + 500 mg enzima B	8/10 (80%)	40.2 ± 6.8	0.7 ± 0.5
LI + 1000 mg enzima C	8/10 (80%)	31.5 ± 3.4	0.2 ± 0.1
LI + 1500 mg enzima D	8/10 (80%)	24.1 ± 4.2	0.2 ± 0.1
LI + 2000 mg enzima E	5/10 (50%)	20.2 ± 3.9	0.1 ± 0.1
LI + 2500 mg enzima F	3/10 (30%)	16.3 ± 4.4	0.4 ± 0.1
Leche hidrolizada (LH) G	0/10 ----	8.2 ± 1.6	0.2 ± 0.1



Por definición, el 100% de los sujetos fueron malos digestores con la leche intacta, esto se redujo a 80% de los sujetos mediante la adición de 500 a 1500 mg de la enzima; es decir, con los tratamientos C, D y E, 8 de los 10 sujetos alcanzaron un incremento en la excreción de hidrógeno  $\geq$  20 ppm y por lo tanto se considera que presentaron cantidades significativas de lactosa que no fueron digeridas. La adición de la enzima en mayores cantidades hizo que 50% de los sujetos fueran malos digestores con 2000 mg de la enzima (tratamiento E), y sólo 30% con 2500 mg de la enzima (tratamiento F). Los valores con estos dos tratamientos aunque constituyen disminuciones importantes, son más altos que el valor encontrado con la leche hidrolizada (tratamiento G).

Una tendencia similar se observa cuando se compara los incrementos en la excreción de hidrógeno, aunque se observa una disminución en la excreción de hidrógeno y por lo tanto en la mala digestión de la lactosa, con cualquiera de los niveles de enzima adicionados, estos solo son significativos con 2000 y 2500 mg de la enzima. Esta disminución, sin embargo, aún con la dosis más alta de la enzima, no logró una hidrólisis completa de la lactosa en la leche, según se demuestra por la comparación de este tratamiento con la prueba de LH.

En lo que se refiere a la tolerancia, los niveles de intolerancia alcanzados con cualquiera de los tratamientos no son clínicamente relevantes.

Cabe mencionar que las dosis de enzima utilizados en el presente estudio se seleccionaron considerando investigaciones previas (Rosado J. L., 1985, 1988) y los niveles de actividad reportados por el grupo del CEINGEBI para el producto desarrollado.

### Discusión y Conclusiones

Se evaluó la actividad in vivo, del extracto enzimático producido en el proyecto. La enzima corresponde a células completas de levadura secas con una actividad de 2000 U/g. En los estudios se observó que el comportamiento de este producto con respecto a la excreción de hidrógeno es intermedio entre el presentado por las enzimas

purificadas de *K. lactis* y de *Aspergillus oryzae*. Es posible explicar este comportamiento si se considera que se trata de células completas. Podemos concluir que el producto presente una adecuada actividad in vivo recomendándose un estudio de intolerancia con una dosis de 2000 mg. para establecer claramente el tratamiento adecuado para la terapia adecuada a personas intolerantes.

#### REFERENCIAS

Rosado JL; (1985) Análisis de H<sub>2</sub> espirado como índice de absorción de carbohidratos. Rev Inv Clin (Méx) 37:261.

Rosado JL.,(1985) Solomons NW, Allen LH. Milk consumption symptoms response and lactose digestion in milk intolerance. Am J Clin Nutr 45: 1457-1460.

Rosado JL, Solomons NW, Lisker R, et al; (1988) Enzyme replacement therapy for primary adult lactase deficiency: Effective reduction of lactose malabsorption and milk intolerance by direct addition of beta-galactosidases to milk at meal time.

Derman JA, Modler S, Olson A; (1981) Role of pH in production of hydrogen from carbohydrate by colonic bacterial flora. J Clin Inv 67: 643-650.

Snedecor GW Cochran WG; (1989) Statistical methods. The Iowa State University Press. Ames Iowa.

Rosado JL, Pineda O, Solomons NW. Hidrólisis in vivo de lactosa con beta galactosidasa de origen microbiano. Análisis Cinético. Rev Tecnol Alim 20 (3): 5-10.

## Escalamiento del proceso de purificación de la lactasa.

### Resumen

El objetivo de los presentes estudios fué el de establecer el proceso de purificación de la lactasa por un sistema acuoso de dos fases y precipitación con PEG 6000, a nivel de planta piloto.

En el proceso se consideran dos etapas fundamentales, la primera denominada como eliminación de restos celulares, en donde el extracto celular obtenido por ruptura en el homogenizador, se suspende en un sistema con 25% P/V PEG 400 y 9% P.V de fosfatos, se mezcla y se centrifuga para la eliminación de los restos celulares. La fase superior recuperada de esta etapa se le adiciona PEG 6000 al 10% P/V para la precipitación de la lactasa.

El volumen de trabajo ensayado en la primera etapa fué de 1 litro y los porcentajes entre la enzima y la proteína recuperada a nivel laboratorio y planta piloto vario entre 4 y 11% para la enzima y de 2 a 5% para la proteína. El factor de purificación obtenido en esta etapa en el laboratorio fué de 1.7 en promedio y de 1.6 en planta piloto. Por problemas en la calidad del PEG 6000 suministrados no se presentan los datos obtenidos en los experimentos de precipitación.

## Introducción

En el informe pasado (ONUDI 1989) se reportó un proceso de purificación de la enzima lactasa de *K. fragilis*. El proceso consiste en dos etapas, en la primera de ellas se eliminan los restos celulares por medio de un sistema acuoso de PEG 400 y sales de fosfato. En el segundo se mejora el factor de purificación mediante una precipitación de la enzima con PEG 6000 al 10% (Figura 1).

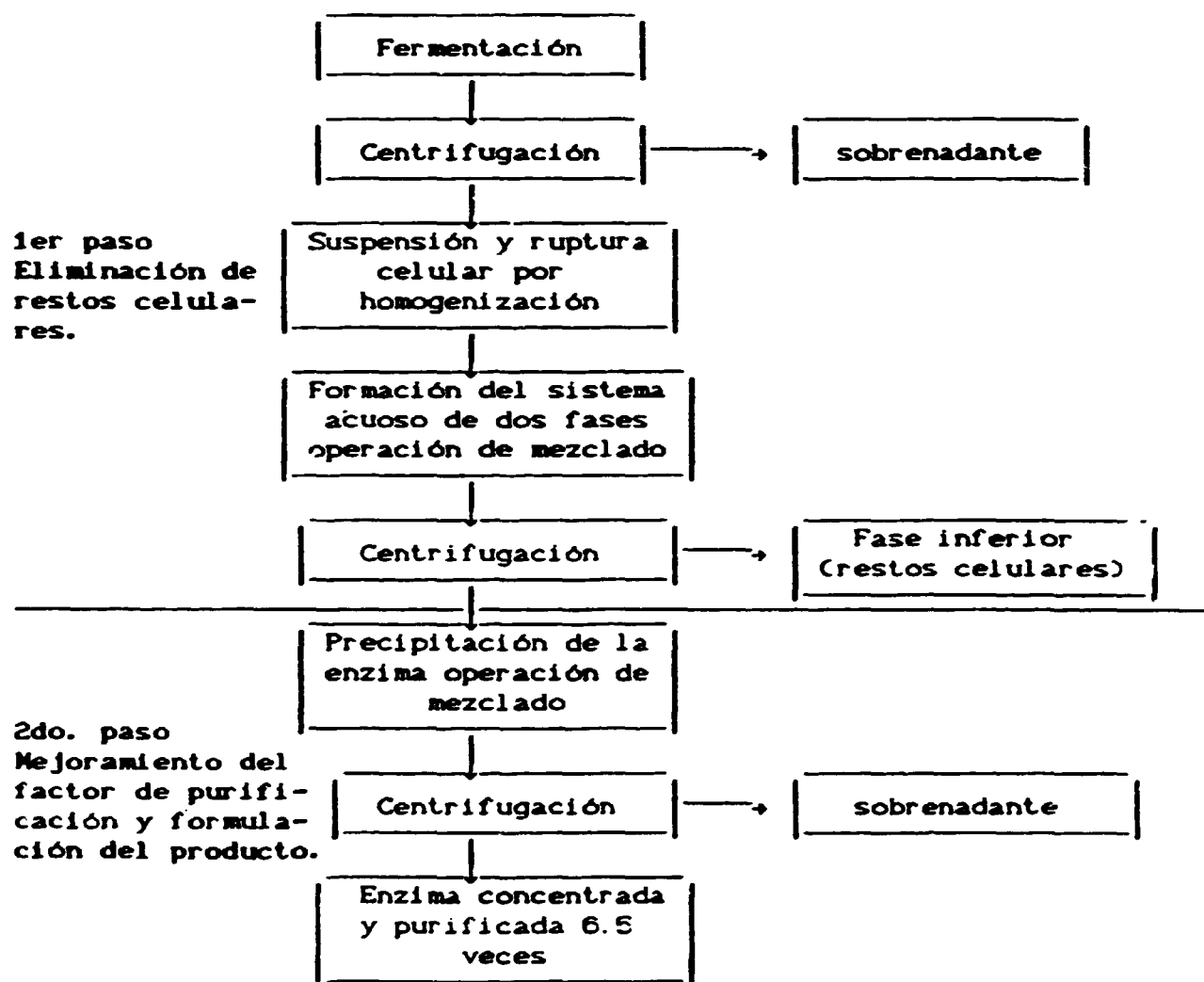


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de purificación de la lactasa mediante un sistema acuoso de PEG 400/fosfatos y una precipitación con PEG-6000.

Debido a que el objetivo del proyecto es el establecer un desarrollo, es que se plantea el estudio del cambio de escala del proceso de purificación de la enzima. Por otro lado, en la literatura se informa que una de las ventajas de la utilización de esta metodología es la de su facilidad para su escalamiento.

El objetivo general del presente trabajo es conocer la factibilidad técnica de realizar el proceso a nivel de producción.

Para lograr este objetivo se plantean los siguientes objetivos parciales.

- 1.- Establecer el proceso de purificación de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. fragilis* a nivel piloto por lotes.
- 2.- Establecer criterios de escalamiento para las diferentes operaciones unitarias en el proceso, en función de las características del proceso y del equipo usado.

Para el establecimiento del proceso de purificación de la enzima a nivel piloto por lotes, se realizaron experimentos en donde se evaluaron diferentes condiciones de operación del equipo para el mezclado y para la centrifugación de cada paso del proceso (sistema acuoso PEG 400/fosfatos y precipitación con PEG 6000).

En los sistemas acuosos de 2 fases la literatura establece que el mezclado no es un problema crítico, puesto que el equilibrio de los componentes se establece rápidamente. El paso limitante en esta operación (mezclado) es la disolución de los componentes, por lo que generalmente se recomienda adicionar éstos en solución.

La separación de las fases de los sistemas se puede realizar bajo la acción de la gravedad, sin embargo para acelerar el proceso se recomienda realizar una centrifugación. Existen varios tipos de separadores recomendados para la separación de fases entre los que tenemos: centrifugas de discos de rotor sólido y centrifugas de discos con boquillas, entre otros.

Por las características de la fase inferior del sistema que empleamos (crestos celulares compactos), consideramos que una centrifuga de rotor tubular puede ser ocupada para este paso.

En la precipitación con PEG, también se tienen que realizar estas dos operaciones unitarias, el mezclado en donde los componentes llegan al equilibrio y la centrifugación para obtener el precipitado. En relación a este punto no existe literatura que indique los criterios para escalar un proceso, sin embargo la precipitación es una operación frecuentemente usada en la industria, por lo que su escalamiento es factible.

#### Metodología.

**Fermentación.** Fermentaciones de 10 lts. Fermentador Microferm MF 114 (New Bruswick Scientific Co. Inc.) 400 rpm .8vvm 29°C 10-12 hrs (Kla 136). (ONUDI 1989).

**Centrifugación.** Centrifuga minisharples 12000 rpm. 200 ml/min. (ONUDI 1989).

**Ruptura celular.** Suspensión celular al 60% en amortiguador de fosfatos .1M pH 6.6. 10 pases en el homogenizador de alta presión Mauton Gaulin a 600 kg/cm<sup>2</sup>.

#### Eliminación de restos celulares (Sistema PEG 400/fosfato)

##### A) Material

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	42 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	58 gr
PEG 400	220 ml
Agua	330 ml
Extracto celular	500 ml

##### B) Equipo

Reactor de 2 lts. (Multigen, New Bruswick Scientific Co. Inc.) con un impulsor A-310 de flujo axial (Lightnin), diámetro del impulsor 6.35

cm (2.5"). 4 mamparas 1.35 cm. Diámetro del tanque 10.9 cm. Impulsor colocado a partir del fondo a una altura del tanque a un tercio del diámetro del tanque.

#### C) Mezclado.

1. En el reactor se adicionaron el polietilenglicol 400, el agua y las sales (polvo) y se mezclaron durante 5 min. aproximadamente a 400 rpm.
2. En seguida se adicionó el extracto celular y se mezcló durante 30 min a 400 rpm. Durante el mezclado se midió la temperatura y el pH.
3. Se tomó muestra (20 ml) a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, con el objeto de determinar el tiempo mínimo de mezclado en la eliminación de restos celulares.
4. Las muestras fueron centrifugadas, 15 minutos a 5.5 krpm (aprox. 4750 g) en el rotor HB-4 (Sorvall). A las fases superior e inferior obtenidas se les hicieron las determinaciones correspondientes (determinación de actividad enzimática, proteína, D.O. pH, peso húmedo).

#### D) Centrifugación

- 1.- El material que quedo en el tanque (900 ml aprox) se uso para establecer las condiciones de centrifugación usando la centrifuga minisharples a 12.000 rpm (3,540 g). Las condiciones específicas para los experimentos son mostradas en la tabla 1.

Tabla 1. Flujo empleado para la eliminación de restos celulares centrifuga Minisharples 3,540 g.

Experimento	Flujo (ml/min)
Primero	60
Segundo	110
Tercero	100

2. Las muestras de la fase superior obtenidas en la centrifugación en planta piloto, así como los restos celulares que quedaron en el rotor de la centrifuga fueron analizadas y los resultados obtenidos fueron comparados con los datos de la cinética de mezclado para establecer si las condiciones usadas (centrifuga ó flujo) eran adecuados para este primer paso de purificación.

#### Precipitación con PEG 6000 (0%).

##### A) Material

- Fase superior obtenida en los experimentos de eliminación de restos celulares en planta piloto
- Solución de PEG 6000 50% p/v.
- Agua
- Acido fosfórico (1:50 v/v).

##### B) Equipo

- Reactor, el mismo que se uso para el primer paso de purificación. La unica diferencia es que se usó a 200 rpm.
- Centrifuga tubular minisharples 12000 rpm.

##### C) Mezclado

1. A 500 ml de fase superior se le ajustó el pH (6.0) con ácido fosfórico.
2. A esta fase se le adicionó agua para llegar a un volumen final de 800 ml.
3. Enseguida se adicionó 200 ml de PEG 6000 (50% p/v) y se mezcló a 200 rpm durante 30 min. En el transcurso del mezclado, al igual que en la eliminación de restos celulares se monitoreó el pH y la temperatura.
4. Se tomaron muestras de 10 ml, cada 5 min. Las muestras fueron centrifugadas a 6000 rpm (3000 g aprox) durante 40 min, en el rotor SS-34 (Sorvall).
5. A los sobrenadantes y precipitados obtenidos se les determinó actividad enzimática y proteína, para establecer el tiempo mínimo de mezclado.



#### D) Centrifugación

1. El material que quedó en el reactor se uso para establecer las condiciones de centrifugación en la minisharples. Las condiciones que se probaron fueron 12 krpm a 100, 50, y 35 ml/min respectivamente, según el orden en los experimentos.
- 2 A los sobrenadantes y precipitados obtenidos se les determinó actividad enzimática y proteína. Comparándose los resultados con los obtenidos a nivel laboratorio (control).

#### Resultados

##### Eliminación de restos celulares.

Una vez obtenido el extracto celular como se describe en materiales y método, se procedió al establecimiento del sistema de dos fases PEG 400/fosfatos para la eliminación de restos celulares.

Como se mencionó anteriormente, el paso limitante en esta etapa es la solubilización de los constituyentes del sistema para alcanzar el equilibrio y la formación de las fases. Así el objetivo del presente estudio fué el de observar en volúmenes de 1 litro que tan crítico era el mezclado en la solubilización de las sales para alcanzar el equilibrio. Y una vez alcanzado y recuperado los restos celulares en la fase inferior, verificar que realmente estábamos trabajando con un sistema de dos fases y observar la variación en la composición de éstas; comparando los resultados obtenidos en el laboratorio y planta piloto. Para cumplir dicho objetivo se realizó una cinética de mezclado, como se describe en la sección de metodología sección eliminación de restos celulares.

Los resultados obtenidos en los experimentos de eliminación de restos celulares correspondientes al mezclado y centrifugación son mostrados en la tabla 1, 3, 4, 5 y 6. Estos indican que desde los 5 minutos las sales en el sistema se han solubilizado y por lo tanto este ha alcanzado el equilibrio. Por lo tanto las diferentes determinaciones realizadas durante el transcurso del mezclado (5 a 30 min) no

presentan variaciones significativas que indiquen la necesidad de mezclar durante periodos largos de tiempo para que se disuelvan las sales y se alcance el equilibrio en el sistema.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en relación a la tasa de volumen de los diferentes sistemas, analizados durante el mezclado (de los 3 experimentos). Como se puede observar la tasa de volúmenes en los sistemas de laboratorio un promedio es de 2.8, en cambio la determinación en planta piloto fue de 3.4-5.0. Esta diferencia se debe a condiciones de manejo de equipo, más que a diferencias de los sistemas acuosos obtenidos.

Tabla 1. Tasa volumétrica y obtención de masa celular en la etapa de eliminación de restos celulares.

Tiempo min	Vsup/Vinf*			pH Fase Sup			Peso húmedo de F. Inf.		
	Exp. 1	2	3	1	2	3	1	2	3
5	2.8	2.8	2.6	6.80	6.72	6.88	50	59	57
10	3.2	2.8	-	6.76	6.68	-	53	58	-
15	2.8	2.8	2.5	6.74	6.82	6.80	53	58	54
20	2.8	2.7	-	6.79	6.82	-	55	61	-
25	2.8	2.7	-	6.74	6.72	-	57	59	-
30	2.7	2.8	2.7	6.75	6.72	6.79	58	58	54
Planta Piloto	3.5	5.0	3.4				53	58	37

\*Tasa de vol. Para su cálculo se considera la densidad de la fase inferior igual a 1.

En la misma tabla se muestra el peso húmedo de los restos celulares obtenidos en la fase inferior de los diferentes sistemas analizados. Como se puede observar la humedad es de 50-60% tanto en las fases inferiores obtenidas en el laboratorio, así como en las obtenidas en planta piloto.

En la tabla 2 se muestra la composición de cada una de las fases del

sistema usado para la eliminación de restos celulares, como se esperaba hay una diferencia considerable en la concentración de PEG entre la fase superior e inferior, en cambio la concentración de sales es similar en ambas fases. El hecho de que la concentración de PEG difiera de una fase a otro indica que en realidad se está formando el sistema acuoso y que la separación de los restos celulares no se debe a un fenómeno de floculación y/o precipitación.

La no variación en la concentración de sales de la fase inferior, se puede explicar si el sistema acuoso que usamos está cerca del punto crítico. En esta zona la composición de las fases en sales difiere muy poco.

Tabla 2. Composición de cada una de las fases del sistema acuoso PEG 400/fosfato empleado para la eliminación de restos celulares.

	Fase superior		Fase inferior	
	PEG (mg/ml)	sales (mg/ml)	PEG (mg/ml)	sales (mg/ml)
Sistema 1	263	102	136	109
Sistema 2	272	117	159	128

En la tabla 3 se comparan los resultados obtenidos en sistemas de laboratorio y planta piloto en relación a la recuperación de la enzima y proteína en cada una de las fases, así como la actividad específica y el factor de purificación. En dicha tabla se observa que la diferencia entre el nivel laboratorio y nivel planta piloto es mínima, y es el resultado de una variación experimental, más que a una diferencia en los sistemas acuosos obtenidos. Así por ejemplo el rendimiento de la enzima en la fase superior presenta una variación del 4-11% y el de proteína del 2-5% entre lo determinado en el laboratorio y la planta piloto. En la fase inferior la variación del rendimiento de enzima y de proteína es de 1-7% y del 6-22% respectivamente. La actividad específica y el factor de purificación en la fase superior presenta una variación de 2 U/mg y de .1 a 4 respectivamente.

**Tabla 3. Recuperación de lactasa en la etapa de eliminación de restos celulares.**

No. exp.	Fase Superior											
	1				2				3			
Escala	Enz. (%)	Prot (%)	Act. (u/mg)	Esp FP	Enz. (%)	Prot (%)	Act. (u/mg)	Esp FP	Enz. (%)	Prot (%)	Act. (U/mg)	Esp FP
Laboratorio	92	56	25	1.6	95	51	28	1.9	82	46	26	1.8
Planta Piloto	88	54	23	1.5	84	56	23	1.5	89	48	25	1.8
Fase Inferior												
Laboratorio	17	51			13	44			19	37		
Planta Piloto	16	45			8	22			12	37		

En las tablas 4, 5 y 6 se presentan los datos de los experimentos antes mencionados de manera más detallada.

**Tabla 4. Primer experimento de eliminación de restos celulares mediante un sistema de PEG 400/fosfato (1L).**

Tiempo (min)	ENZIMA		PROTEINA		F. SUP	
	F. Sup (%)	F. Inf (%)	F. Sup (%)	F. Inf (%)	Act. Esp U/mg	F. P
5	90	15	52	42	25.8	1.7
10	87	15	52	38	24.9	1.6
15	89	17	54	45	24.9	1.6
20	84	16	53	47	23.9	1.6
25	88	18	56	50	23.7	1.5
30	92	17	56	51	24.8	1.6
Planta Piloto	88	16	54	45	23	1.5

\*Nota. Se partió de un extracto celular con las siguientes características: Volumen de 460 ml, actividad enzimática de 3020 U/gr de extracto, proteínas de 20 mg prot/gr ext. y una actividad específica de 15 U/mg.

**Tabla 5. Segundo experimento de eliminación de restos celulares mediante un sistema de PEG 400/fosfato (1L).**

Tiempo (min)	ENZIMA		PROTEINA		F. SUP	
	F. Sup (%)	F. Inf (%)	F. Sup (%)	F. Inf (%)	Act. Esp U/mg	F. P
5	89	14	51	43	29.3	1.9
10	71	14	55	43	19.3	1.3
15	67	13	57	42	17.7	1.2
20	92	14	58	40	23.7	1.6
25	71	18	55	49	19.4	1.3
30	95	13	51	44	28.0	1.9
Planta Piloto	84	8	56	22	23	1.5

\*Nota. Se partió de un extracto celular con las siguientes características: volumen de 500 ml, actividad enzimática de 432 U/gr de extracto celular, proteína de 28.7 mg/gr de ext. y una actividad específica de 15 U/mg.

**Tabla 6. Tercer experimento de eliminación de restos celulares mediante un sistema de PEG 400/fosfato (1L).**

Tiempo (min)	ENZIMA		PROTEINA		F. SUP	
	F. Sup (%)	F. Inf (%)	F. Sup (%)	F. Inf (%)	Act. Esp U/mg	F. P.
5	81	20	50	46	23.1	1.6
15	79	20	48	45	23.0	1.6
30	82	19	46	37	25.0	1.8
Planta Piloto	89	12	48	37	25.4	1.6

\*Nota. Se partió de un extracto celular con las siguientes características: volumen de 500 ml, actividad específica de 434 U/gr de extracto, proteína 31 mg/gr de extracto celular y una actividad específica de 14 U/mg.

## Precipitación con PEG 6000 (10%).

Estos estudios se realizaron y solo se presentan algunos comentarios, debido a que se presentaron problemas con el lote de PEG 6000 utilizado. Este no presenta la misma concentración que el lote de PEG anteriormente utilizado.

Este incidente repercutió en los experimentos a nivel laboratorio. Sin embargo con el objetivo de poder darnos una idea del escalamiento del proceso de precipitación, se comentan los experimentos realizados.

Para el establecimiento de la precipitación con PEG a nivel piloto por lotes, al igual que con el sistema acuoso de 2 fases se hicieron experimentos con un volumen de trabajo de 1 lt. en donde se estudiaron aspectos de mezclado y de centrifugación. El diseño experimental fue el mismo que para la eliminación de restos celulares, en el sentido de que se mezclaron los componentes de la precipitación, en el mismo tanque a 200 rpm durante 30 minutos y se tomó muestra cada 5. Las muestras fueron centrifugadas, bajo las condiciones establecidas en el laboratorio y los sobrenadantes y precipitados analizados para comparar los datos obtenidos con otros experimentos de precipitación a nivel laboratorio (10 ml), al mismo tiempo que servían como control para el sobrenadante y precipitado obtenido en planta piloto.

De estos experimentos se puede concluir que el rendimiento de la enzima y proteína en el precipitado obtenido en planta piloto difieren significativamente de los rendimientos obtenidos en los precipitados en el experimento de mezclado, lo cual indica que las condiciones de centrifugación son determinantes para la precipitación con PEG.

Lo que se recomienda es resolver primero el problema de precipitación a nivel laboratorio, y después realizar un experimento que indique la influencia de la centrifugación en la precipitación, para probar otras condiciones en la centrífuga minisharples o proponer el uso de una centrífuga de otro tipo.

## Discusión y conclusiones

A las conclusiones que llegamos con estos experimentos es que eliminación de restos celulares por medio de un sistema acuoso de PEG 400/fosfato a nivel piloto (1 Lt), se puede realizar en las siguientes condiciones:

**Mezclado.** Reactor de 2 lts con un diámetro de tanque de 10.9 cm. Un impulsor A-310 de flujo axial, colocado a partir del fondo del tanque a una altura de 1/3 del diámetro del tanque, mezclando 5 minutos a 400 rpm.

**Separación de fases.** La separación de los restos celulares se puede usar la centrifuga minisharples (12 Krpm) a un flujo de 100 ml/min.

El hecho a que la separación de fases se pueda realizar en una centrifuga de rotor tubular, se debe básicamente a las características que presenta la fase inferior obtenida: restos celulares compactos con el 50-60% de humedad.

Si bien es cierto que el primer paso de purificación se puede efectuar con el equipo antes mencionado, es necesario realizar otros experimentos en donde se afinen condiciones de manejo de la centrifuga, porque genealmente la fase superior de planta piloto se ve contaminada por restos celulares al principio o al final de dicha operación.

Una vez habiendo establecido el primer paso de purificación en planta piloto, se plantea escalar dicho paso a un volumen de 10 lts. El criterio para realizar el cambio de escalas en el mezclado será potencia por unidad de masa (FAuquex P.F et al 1985).

El cambio de escala en la centrifugación se hará en función del área de sedimentación ( $\Sigma$ ) de las centrifugas usadas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{Q_1}{\Sigma_1} = \frac{Q_2}{\Sigma_2}$$

donde  $Q_1$  y  $Q_2$  es el flujo de alimentación y  $\Sigma_1$  y  $\Sigma_2$  es el área de las centrifugas.

1 Corresponde a la centrifuga, en donde se ha establecido el proceso.

2 Corresponde a la centrifuga que se va a emplear para el escalamiento.



## Manufactura y aplicación de un biocatalizador con células inmovilizadas. Reactores enzimáticos.

### Resumen:

Se montó un proceso a nivel laboratorio para la hidrólisis de lactosa en suero de leche, utilizando una columna empacada con recirculación como reactor enzimático. Se estudiaron las características del sustrato utilizado y se establecieron las políticas de operación y saneamiento del reactor. Además, se estudiaron las variables que afectan la estabilidad de catalizador y se plantearon algunas alternativas para la optimización del proceso.

Los estudios nos indican que la estabilidad del biocatalizador a 40° es aceptable ya que éste retiene el 100% de su actividad inicial durante 192 horas cuando se opera en un reactor de columna recirculada con buffer a esta temperatura, así como en matraces agitados usando lactosa y suero como sustratos. También se concluye que con el biocatalizador en forma de fibras se recomienda operar un reactor de canasta y no una columna recirculada debido a los problemas en el desgaste de las fibras por el flujo. En este sentido se recomienda explorar el uso de esferas en este tipo de reactor. Por último se concluye que la mejor opción en el uso de agente sanitizante es el peróxido de hidrógeno.

## Introducción

Uno de los objetivos del proyecto es el de establecer el proceso de hidrólisis de la lactosa en suero de leche en reactores enzimáticos. Los estudios concernientes al manejo de reactores se ha planteado considerandose la estabilidad operacional, las políticas de saneamiento, las características del sustrato y la elección del reactor.

Tomando en cuenta lo anterior, los estudios que aquí se presentan consideran: a) El análisis de algunas variables que limitaban la expresión de la enzima en suero de leche y b) La selección y operación de un reactor que permita la utilización óptima del catalizador, el cual pueda ser escalado a nivel piloto.

### a). Actividad lactasa en suero de leche.

En referencia a esto se ha visto que la actividad de la enzima es 1.6 veces menor en soluciones de suero de leche ajustado al 5% de lactosa que en soluciones de lactosa a la misma concentración. De acuerdo a algunos autores (Agbebavi, 1986; Mahoney, 1980) este efecto se debe al ambiente iónico en el suero y principalmente a la presencia de iones calcio, que se ha comprobado tienen un efecto inhibitorio sobre la enzima lactasa, sea cual fuere su fuente de obtención.

También se reporta que, al parecer, la presencia de proteína en el suero de leche no tiene mayor efecto sobre la actividad de la enzima.

El contenido de calcio del suero varía de lote a lote y esto a veces es determinado por las necesidades de los consumidores de suero. En ocasiones se les recomiendan a las productoras de suero determinados niveles en el contenido de calcio por lo que estas empresas se ven en la necesidad de ajustar esta concentración.

El suero de leche es un sustrato que por su naturaleza y composición presenta un alto desarrollo de microorganismos en tiempos relativamente cortos. Se tiene contemplado utilizar como sustrato, en

esta etapa del proceso, suero dulce completo, secado por aspersion. (tabla 1).

Tabla 1.- Composición del suero de leche deshidratado utilizado como sustrato en el proceso (proveedor: Kemfuds S.A.).

---

Lactosa	75%
Grasa	2%
Proteína	12%
Minerales	8%
Humedad	3%

---

La materia prima utilizada, reconstituida sin ningún tratamiento presenta una flora microbiana abundante ( $>10^9$  microorganismos/ml) en la que se incluyen bacilos gram (+), bacilos gram (-) y levaduras.

Una estrategia congruente con lo anteriormente expuesto sería el tratar de eliminar la presencia de los iones calcio de la solución de suero de leche y evaluar si esto incrementa de manera significativa la actividad de la enzima.

Considerando lo anterior podemos decir que la calidad de la materia prima estará determinada por los niveles de calcio presentes en el suero y la carga microbiana que presente.

Es bien conocido el efecto quelante de algunos compuestos sobre cationes divalentes como es el caso del ión calcio ( $Ca^{++}$ ). Furia (1972) reporta las condiciones óptimas para esta quelación (tabla 2), siendo, por mucho, el EDTA el compuesto más efectivo para este propósito.

Uno de los inconvenientes de utilizar agentes quelantes en un sistema como el que requiere la enzima lactasa consiste en que la enzima necesita cationes divalentes ( $Mg^{++}$  y  $Mn^{++}$ ) para su activación por lo que se corre el riesgo de quelación de estos iones con la consecuente pérdida de actividad. El establecimiento de las condiciones de quelación se plantea como uno de los objetivos del presente estudio.

**Tabla 2. - Constantes de estabilidad (K<sub>i</sub>) de  
varios quelantes de calcio.**

---

<b>Agente quelante</b>	<b>log K<sub>i</sub></b>
Albúmina	2.2
Caseína	2.23
Acido maléico	2.43
Acido oxálico	3.0
EDTA	10.7

---

**b). Selección y operación del reactor enzimático.**

En el contexto de un desarrollo tecnológico que involucra un proceso de tecnología enzimática, la elección del tipo de reactor a utilizarse en dicho desarrollo, constituye una decisión crítica que repercutirá enormemente en la viabilidad técnica y económica del proceso final.

Existen en la literatura numerosos reportes acerca de los diferentes tipos de reactores que pueden ser utilizados en un proceso de catálisis enzimática (López-Munguía, 1987; Quintero, 1981).

La elección del tipo de reactor depende principalmente de dos factores:

-El tipo de catalizador que se va a utilizar, considerando su composición, la forma, el tamaño y su resistencia.

-El comportamiento cinético de dicho catalizador en cuanto a si presenta o no inhibición (por sustrato o por producto).

Un factor adicional que debe ser contemplado en un desarrollo tecnológico lo constituye la viabilidad del escalamiento del proceso utilizando el reactor seleccionado.

Uno de los factores más importantes a ser tomados en cuenta para la

selección del reactor es el hecho de contar, en el presente caso, con un catalizador en forma de fibras elaborado a base de gelatina (ONUDI, diciembre, 1989). Esto imposibilita la utilización de un reactor que considere en su operación un tipo de agitación con grandes esfuerzos de corte, por la fragilidad que presenta.

El presente estudio también incluye la estabilidad operacional del catalizador en el reactor seleccionado y las políticas de sanitización establecidas para el proceso.

## **Materiales y métodos.**

**Microorganismo:** *Kluyveromyces fragilis* NRRL-Y1109.

**Propagación:** Para la obtención de la biomasa las células se propagaron en matraces fernbach, jarras de 14 litros y fermentador de 100 litros, tal y como se reporta en un informe anterior (ONUDI, marzo de 1989).

**Inmovilización de células:** La inmovilización de las células se llevó a cabo tal y como se describe en el informe ONUDI, marzo de 1989.

**Determinación de actividad enzimática en células libres:** La actividad de la enzima se determinó utilizando soluciones de lactosa y suero con una concentración de 5% de lactosa en ambos casos. Se utilizaron 5 mg de células en ambos sustratos a 40°C y se tomaron muestras cada 5 minutos durante 20 minutos, deteniendo la reacción en cada muestra colocandolas en agua a ebullición durante 5 minutos.

La cantidad de glucosa generada por la acción enzimática se determinó utilizando un analizador de glucosa (glucose analyzer 2, Beckman).

**Determinación de actividad en células inmovilizadas en fibras.** Se tomaron 70 mg de catalizador (peso húmedo) y se siguió la misma metodología utilizada en la medición para las células libres.

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de catalizador (células libres o fibras) necesaria para generar 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto a 40°C.

**Medición de la concentración de calcio:** Para la determinación de los niveles de calcio se siguió el método de *dureza de calcio* el cual consiste en realizar una titulación con EDTA (0.01 M a 50 ml de muestra, utilizando como indicador murexida. El cambio de color nos indica el final de la titulación.

## Resultados

### Efecto del ión calcio sobre la actividad de la enzima.

Para el inicio de los estudios del efecto del ión calcio sobre la enzima lactasa se realizó un experimento que consistió en adicionar diferentes cantidades de calcio a soluciones de lactosa al 5% y éstas se utilizaron como sustrato para células libres con actividad lactásica (tabla 3).

Tabla 3.- Efecto del ión calcio sobre la actividad lactásica en soluciones de lactosa.

[Ca <sup>++</sup> ] mg/100 ml	Actividad específica (u/g)	% de actividad
0	2248	100
6.6	1931	85
13.2	1959	87
19.8	1816	80
26.4	1763	78
33	1543	68

La concentración de Ca<sup>++</sup> se ajustó con la cantidad necesaria de CaCl<sub>2</sub>.

Como se aprecia en la tabla, es notorio el efecto del ión calcio sobre la actividad de la enzima por lo que su eliminación del suero podría repercutir grandemente sobre la expresión de la enzima.

Con el fin de determinar los niveles de calcio en los diferentes lotes de suero disponibles en el laboratorio se implementó una metodología para su medición (ver metodologías), obteniendo los siguientes resultados (tabla 4):

La eliminación de los iones calcio del suero puede llevarse a cabo por precipitación o por quelación. En el primer caso se puede separar el calcio del seno del líquido por filtración o centrifugación. En el

**Tabla 4.- Niveles de Ca<sup>++</sup> en los diferentes lotes de suero disponibles en el laboratorio.**

Lote	Proveedor	[Ca <sup>++</sup> ] mg/100 ml
A	Givaudan S. A.	48
B	Kemfuds S. A.	84
C	Kemfuds S. A.	64
D	Kemfuds S. A.	32

segundo caso, el complejo Ca-agente quelante se encuentra en solución, sin embargo, la acción inhibitoria del catión se vé bloqueada.

El hecho de tener un precipitado en el suero provoca que tengamos que implementar un proceso adicional para su eliminación, por lo que se decidió intentar la quelacion con EDTA (etilendinitrilotetraacetato).

El estudio de quelación se inició con relaciones mol a mol de Ca:EDTA de 1:0.5 hasta relaciones de 1:3, según se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5.- Estudio de quelación del ión Ca<sup>++</sup> en soluciones de suero.\***

Relación Ca:EDTA	Actividad específica (u/g)
Control (sin EDTA)	1729
1:0.1	1554
1:0.15	1627
1:0.2	2404
1:0.25	2299
1:0.3	2000
1:0.5	2057
1:1	1977
1:2	1346
1:3	544

\* Se utilizó el lote de suero C y células libres con actividad lactasa.

En los resultados presentados en la tabla 5, se observa un pico en la actividad específica (30% mayor) lo que indica una posible quelación



parcial del calcio presente en el suero. Sin embargo, al incrementar los niveles de EDTA se observa una caída drástica de la actividad de la enzima, lo cual lo atribuimos a la quelación de otros cationes divalentes en el suero (Magnesio y Manganeso), responsables de la activación de la enzima.

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en células libres se probaron células inmovilizadas con diferentes concentraciones de EDTA en suero, de acuerdo a la tabla 6.

En el sistema con células inmovilizadas, la relación Ca:EDTA óptima para la expresión de la actividad enzimática es un poco diferente que para las células libres, hecho que seguramente está asociado a fenómenos de difusión en el catalizador.

Tabla 6.- Efecto del agente quelante EDTA en soluciones de suero sobre la actividad enzimática de células inmovilizadas.

Relación Ca:EDTA	Actividad específica (u/g)	% de actividad
Control	93.5	100
1:0.2	120.5	129
1:0.25	161.5	173
1:0.33	142	152

#### Diseño del reactor.

El tipo de reactor que fué considerado para trabajar en esta etapa del proyecto es un reactor de lecho empacado y con recirculación del sustrato. A escala de laboratorio el reactor tiene las siguientes características:

longitud: 7 cm

diámetro: 1.9 cm

volumen: 20 ml

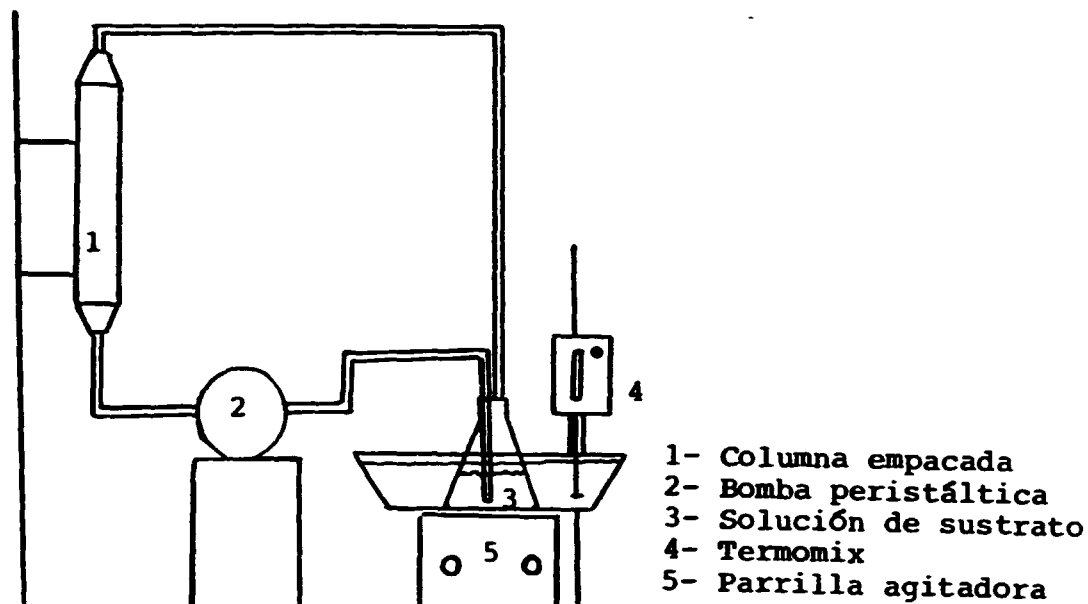


Figura 1.- Representación esquemática del reactor utilizado.

La manera de operar el reactor se presenta en la figura 1 y consiste en recircular el sustrato a través de la columna empacada hasta obtener el % de conversión deseado por lo que el comportamiento cinético del sistema corresponde al tipo descrito para un tanque agitado.

#### Estudios de saneamiento del reactor.

La contaminación microbiana en reactores es un fenómeno muy frecuente, sobre todo si el proceso realizado implica la utilización de un sustrato rico en nutrientes y temperaturas cercanas a los 37°C, como es el caso presente.

Un tratamiento de pasteurización del suero ( 63°C durante 40 minutos) reduce considerablemente la cantidad de microorganismos ( < 10<sup>4</sup>  $\mu$ os/ml) por lo que se consideró innecesario un tratamiento adicional al suero .

Al realizar hidrólisis sucesivas de 1.5 horas en estas condiciones (solo con pasteurización del suero), no se detecta un incremento

significativo de la flora microbiana en las primeras horas, incluyendo la flora de las fibras. A partir de la cuarta corrida (seis horas) la cantidad de microorganismos se incrementa de manera significativa lo que indica que las fibras han empezado a retener microorganismos, siendo insuficiente los simples lavados con solución buffer de la columna al término de cada hidrólisis.

Esto nos indicaba la necesidad de establecer políticas de sanitización del reactor con el fin de evitar la contaminación del producto hidrolizado.

Se realizó una revisión en la literatura acerca de los agentes sanitizantes más frecuentemente usados en reactores con enzimas inmovilizadas (Barndt, 1975; Pastore, 1974), con el fin de seleccionar aquellos que pudieran ser probados en nuestro reactor. Se seleccionaron tres agentes en base a su frecuencia de uso y accesibilidad en el mercado: a) peróxido de hidrógeno, b) cloruro de benzalconio y c) solución de Iodo.

Con el fin de determinar el efecto del agente sanitizante sobre la población microbiana de las fibras y sobre la actividad específica de las mismas se fabricó un lote de fibras y se incubó por 12 horas en una solución de suero al 5% de lactosa a 40°C. Después de este tiempo se midió la actividad específica de las fibras y se realizó una cuenta total microbiana en placa de los microorganismos en la fibra, obteniendo lo siguiente:

Actividad de las fibras: 120 u/g

Cuenta total en placa :  $>10^9$   $\mu\text{os/g}$ . de fibra.

Tomando las fibras anteriores se procedió a realizar un diseño experimental tipo Box Wilson para cada sustancia de acuerdo al siguiente protocolo:

Agente Sanitizante: Peróxido de hidrógeno

Variable	centro experimental	unidad exp.	nivel +	nivel -
Concentración.	0.1%	0.05%	0.05%	0.15%

Variable	centro experimental	unidad exp.	nivel +	nivel -
Temperatura	33°C	7°C	40°C	25°C
Tiempo de exposición	20 minutos	10	30	10

Agente sanitizante: Cloruro de benzalconio

Variable	centro experimental	unidad exp.	nivel +	nivel -
Concentración	100 ppm	50 ppm	150 ppm	50 ppm
Temperatura	33°C	7°C	40°C	25°C
Tiempo de exposición	20 minutos	10	30	10

Agente Sanitizante: Solución de Iodo.

Variable	centro experimental	unidad exp.	nivel +	nivel -
Concentración.	0.1%	0.05%	0.05%	0.15%
Temperatura	33°C	7°C	40°C	25°C
Tiempo de exposición	20 minutos	10	30	10

El diseño experimental utilizado fué el siguiente:

#### Diseño Box-Wilson

No de exp.	interacción variables	Nivel		
		A	B	C
1	O	-	-	-
2	A	+	-	-
3	B	-	+	-
4	AB	+	+	-
5	C	-	-	+
6	AC	+	-	+
7	BC	-	+	+
8	ABC	+	+	+

Los resultados obtenidos de este diseño se presentan en las siguientes dos tablas:

**Tabla 7.- Efecto del agente sanitizante en la actividad específica de las fibras en diferentes condiciones.**

No de experimento	Actividad específica U/g		
	Peróxido de hidrógeno	Cloruro de benzalconio	Iodo
1	91	20	88
2	96	44	9
3	77	43	4
4	82	53	0
5	53	24	8
6	37	22	0
7	41	48	0
8	40	36	0

**Tabla 8.- Efecto del agente sanitizante sobre la población microbiana a diferentes condiciones.**

No de experimento	Cuenta microbiana ( $\mu\text{os/g. de fibra}$ )		
	Peróxido de hidrógeno	Cloruro de benzalconio	Iodo
Control	$>1 \times 10^9$	$>1 \times 10^9$	$>1 \times 10^9$
1	$>1 \times 10^6$	$>1 \times 10^6$	$3 \times 10^5$
2	$3 \times 10^4$	$>1 \times 10^6$	$2 \times 10^5$
3	$5 \times 10^4$	$>1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$
4	$8 \times 10^5$	$>1 \times 10^6$	$2 \times 10^5$
5	$3 \times 10^5$	$>1 \times 10^6$	$3 \times 10^5$
6	$6 \times 10^5$	$>1 \times 10^6$	$2 \times 10^5$
7	$4 \times 10^5$	$>1 \times 10^6$	$1 \times 10^4$
8	$>1 \times 10^6$	$>1 \times 10^6$	$5 \times 10^5$

De el análisis de las dos tablas se concluye que el peróxido de hidrógeno puede ser considerado como posible agente sanitizante debido a que presenta un menor efecto sobre la actividad de las fibras y un

mayor efecto sobre la población microbiana.

#### Establecimiento de las condiciones de operación.

Para la realización de las hidrólisis el reactor se cargó con 11 gr de catalizador que desplazan un volumen de 10 ml, por lo que el volumen vacío dentro de la columna, que será ocupado por el sustrato es de 10 ml.

En todas las hidrólisis realizadas en la columna se utilizó como sustrato suero de leche reconstituido a una concentración de 5% de lactosa.

Como ya se había informado anteriormente (ONUDI, diciembre 1989), la temperatura óptima de reacción de la enzima utilizada es de 40°C por lo que se decidió realizar las hidrólisis a esta temperatura.

Se trabajaron diferentes flujos de operación para determinar las condiciones óptimas en cuanto a este parámetro, habiendo establecido el tiempo de hidrólisis y el volumen de sustrato para alcanzar una conversión del 80% (tabla 9).

Tabla 9.- Determinación del flujo de entrada de sustrato a la columna.

ml/min	Flujo	Conversión obtenida	Conversión esperada
	Vs (cm/min)	%	%
17	14.3	65	80
34	28.6	78	80
51	42.9	72	80

En todos los casos se trabajó con 520 ml de suero, 11 gr de fibras con actividad específica de 120 u/g y un tiempo de hidrólisis de 2 horas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se decidió trabajar con un flujo constante de 34 ml/min.

#### Estabilidad operacional del catalizador.

El estudio de estabilidad operacional de un catalizador debe de contemplar dos aspectos principales: la integridad física del catalizador y el mantenimiento de la actividad específica. El primer aspecto se vé influenciado principalmente por el flujo suministrado a la columna y, en este caso, por tratarse de fibras de gelatina, por la temperatura de trabajo.

La actividad específica puede verse afectada por la salida de las células inmovilizadas, por contaminación del catalizador y por inactivación térmica de la enzima al incrementarse el número de corridas realizadas.

En un informe anterior (CONUDI, 1989) se reportó la estabilidad de las fibras (integridad física), puestas en agitación en matraz, a 37°C. De acuerdo a este estudio, las fibras pueden estar sometidas a agitación por un período de 192 horas sin disminución de la actividad específica.

Con el objeto de evaluar la estabilidad del catalizador y discernir entre los efectos de la temperatura de hidrólisis, el sustrato y el flujo utilizado en la columna, sobre dicha estabilidad, se realizaron dos experimentos en columnas empacadas. En uno de ellos se corrieron hidrólisis de sustrato de leche y en el otro se recirculó buffer de fosfatos en ambos a 40°C y se compararon con los resultados de estabilidad en matraz agitado a los que se hizo referencia anteriormente.

Los resultados se presentan en la tabla 10.

Del análisis de los resultados presentados concluimos: que la temperatura de 40°C no afecta la estabilidad de la enzima inmovilizada como se muestra en la columna recirculada con buffer y en matraz

Tabla 10.- Efecto de la temperatura, flujo de entrada y sustrato sobre la estabilidad del catalizador.

Horas	Actividad específica (%)			
	Columna espacada		matraz agitado	
	suero	buffer	suero	lactosa**
0	100	100	100	100
24	100	125	100	100
48	45	141	70	100
72	40	125	70	97
96	n. m.*	100	94	99
120	n. m.	100	95	111
144	n. m.	100	95	115
168	n. m.	100	92	97
192	n. m.	100	94	98

\* no medido.

\*\* lactosa en buffer.

agitado. Por otro lado, el hecho de que el suero presente una mayor densidad e incluso algunos sólidos en suspensión, provoca que la fuerza de desgaste ejercida por el flujo del líquido sobre el catalizador sea mayor. Esto se interpreta como un efecto sinérgico entre la naturaleza del sustrato y el flujo suministrado a la columna, ya que observamos una caída en la actividad específica de las fibras y un desgaste adicional del catalizador.

#### Discusión y conclusión:

Al operar las columnas espacadas se vió que existen problemas asociados a la forma del catalizador (fibras) y estos consisten en la formación de una red compacta que atrapa los sólidos en suspensión en el suero, dando problemas de taponamiento y contaminación de la columna.

El uso de otras alternativas, en cuanto al diseño del reactor, que minimice los problemas expuestos (por ejemplo un reactor tipo canasta) permitiría una utilización mas adecuada del catalizador en forma de



fibras.

Otra alternativa interesante sería la manufactura del catalizador en forma esférica que, con un tamaño de partícula adecuado, permitiera eliminar los inconvenientes asociados a las fibras.

#### Bibliografía.

1. Agbebavi, J.; Rouleau, D. (1986) The effect of whey cations on the kinetic parameters of a model for the enzymatic hydrolysis of lactose. *J. Chem. Biotechnol.* 41, 153-168.
2. Barndt, J.G.; Leeder, J.R. and Kleyn, D.H. (1975). Sanitation of a biocatalytic reactor used for hydrolysis of acid whey. *J. Food Sci.* 40, 291-296.
3. Furia, T.E. (1972). "Secuestrants in Food", en T.E. Furia (Ed.). *Food Additives* CRC Press, Cleveland.
4. López-Munguía, C.A.; Quintero, R.R. (1987). *Tecnología Enzimática*. Universidad Nacional Autónoma de México. Primera edición.
5. Mahoney, R.R.; Adamchuk, C. (1980). Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Sci.* 45, 962-968.
6. Pastore, M.; Morisi, F. and Viglia, A. (1974). Reduction of viscosity of milk by entrapped  $\beta$ -galactosidase. 2. Conditions for industrial continuous process. *J. Dairy Sci.* 57, 200.
7. Quintero, R.R. (1981). *Ingeniería Bioquímica*. Ed. Alhambra Mexicana. Primera edición.