



**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)

20250

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

38 p.  
tráiler  
grupos

DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA OBTENCIÓN DE  
UNA ENZIMA QUE HIDROLICE LA LACTOSA DE  
LECHE Y SUERO

INFORME TÉCNICO FINAL

CONTRATO No. 92/244 P  
Laboratorio de Ingeniería y Bioquímica  
Depto. de Procesos y Sistemas  
Universidad Simón Bolívar  
Caracas, Venezuela

**UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR  
PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA**

**INFORME FINAL DEL  
PROYECTO LACTASA  
CONTRATO 1992-1993**

**REALIZADO POR: Lic. NESTOR GONZALEZ  
Lic. MARCO GONZALEZ  
Lic. VICENTE MICHELENA  
Br. AMMY BORJAS**

**DIRIGIDO POR: LIVIO REVEL-CHION Ph.D.**

**CARACAS, FEBRERO DE 1992**

## INDICE.

1. INTRODUCCION.....	1
2. MATERIALES Y METODOS.....	3
2.1 DETERMINACION DE LA RELACION OPTIMA ENTRE LA CONCENTRACION DE ENZIMA Y EL PESO DE SOPORTE.....	3
2.1.1 INMOVILIZACION DE LACTOZYM 3000L HPG.....	3
2.1.2 INMOVILIZACION DE LACTOZYM 3000L HPG SIN GLICEROL.....	3
2.2 ESTABILIDAD DEL BIOCATALIZADOR EN OPERACION SEMI-CONTINUA EN REACTOR DE LECHO EMPACADO.....	4
2.3 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DEL BIOCATALIZADOR SOBRE DIFERENTES SUSTRATOS.....	5
2.3.1 ACTIVIDAD SOBRE SUERO DE LECHE HIDROLIZADO.....	5
2.3.2 ACTIVIDAD SOBRE LECHE PASTEURIZADA.....	7
2.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	7
2.5 CARACTERIZACION DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.....	7
2.5.1 DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.....	7
2.5.2 DETERMINACION DE LA TEMPERATURA OPTIMA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.....	8
2.5.3 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.....	8

3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	9
3.1 DETERMINACION DE LA RELACION OPTIMA ENTRE LA CONCENTRACION DE ENZIMA Y EL PESO DE SOPORTE.....	9
3.2 ESTABILIDAD DEL BIOCATALIZADOR EN OPERACION SEMI-CONTINUA EMPLEANDO REACTOR DE LECHO EMPACADO.....	11
3.3 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DEL BIOCATALIZADOR SOBRE SUERO DE LECHE HIDROLIZADO.....	15
3.3.1 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD EMPLEANDO SUERO DE LECHE HIDROLIZADO.....	15
3.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL BIOCATALIZADOR SOBRE LECHE PASTEURIZADA.....	17
3.5 CARACTERIZACION DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.....	17
3.5.1 DETERMINACION DEL pH Y TEMPERATURA OPTIMA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.....	17
3.5.2 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.....	21
4. CONCLUSIONES.....	27
5. BIBLIOGRAFIA.....	28

## INTRODUCCION

En el siguiente informe de avance se muestran los resultados obtenidos en la inmovilización de una preparación comercial de  $\beta$ -galactosidasa en derivado vidrio-titanio.

Inicialmente se determinó la relación óptima entre la concentración de enzima (U/ml) y el peso de soporte (gr) en la reacción de inmovilización. Los resultados obtenidos mostraron un valor máximo de 593.08 U/gr de enzima inmovilizada al emplear una relación de 2184 Unidades por gramo de soporte.

Igualmente, se estudió el efecto de la remoción del glicerol (aditivo presente en la preparación enzimática comercial) sobre la inmovilización de la enzima y la actividad expresada por el biocatalizador. Se pudo observar que al emplear una preparación enzimática sin glicerol la actividad expresada del biocatalizador disminuye aproximadamente en un 50%.

En una segunda etapa, se evaluó la estabilidad del biocatalizador en operación semi-continua en un reactor de lecho empacado. Los resultados mostraron valores prometedores en cuanto a la estabilidad y la actividad de la enzima inmovilizada. Efectivamente se encontró un 90% de conversión del sustrato a los 35 días de funcionamiento semi-continuo.

Por otra parte, se determinó la actividad del biocatalizador sobre suero de leche hidrolizado y leche pasteurizada. Los resultados indican que aunque el biocatalizador presenta actividad sobre éstos sustratos es necesario mejorar la remoción de trazas de proteínas y otros compuestos presentes en el suero hidrolizado que de alguna forma disminuyen la actividad de la enzima inmovilizada.

Finalmente se caracterizó el biocatalizador en términos de pH y temperatura óptima y se evaluó el valor de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$ . Se encontró un valor de actividad óptimo a un pH de 6.0 y a una temperatura de 35 °C. Igualmente el biocatalizador presenta un valor de  $K_m$  de 0.1244 M y un  $V_{max}$  de 16,45  $\mu\text{mol}$  de glucosa/min  $\times$  g.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1 DETERMINACION DE LA RELACION OPTIMA ENTRE LA CONCENTRACION DE ENZIMA Y EL PESO DE SOPORTE**

#### **2.1.1 INMOVILIZACION DE LACTOZYM 3000 L HP-G.**

Con la finalidad de determinar la relación óptima entre la concentración de enzima y el peso de soporte en la reacción de inmovilización se adicionó en un tubo de ensayo un peso fijo (0,5 gramos) de soporte activado (según la metodología descrita en la sección 2.6 del Informe de Avance del mes de Diciembre de 1.990) y 1,0 ml de solución de enzima Lactozym conteniendo 136, 190, 365, 566, 1092, 1559 y 2522 Unidades/ml. Posteriormente se realizó la reacción de inmovilización a una temperatura de 4 °C por un periodo de 18 horas. Al finalizar la reacción de inmovilización, se determinó la actividad del biocatalizador empleando lactosa al 20% (p/v) como sustrato.

#### **2.1.2 INMOVILIZACION DE LACTOZYM 3000L SIN GLICEROL.**

Con el propósito de estudiar el efecto de la remoción del glicerol (aditivo presente en la preparación enzimática comercial) sobre la inmovilización de la enzima, se utilizó en el experimento una solución de Lactozym sin glicerol. Para ello, se realizó la precipitación de la enzima adicionando lentamente (gota a gota) y en frío, un volumen de acetona equivalente al 10%



del volumen total del extracto enzimático. Seguidamente, el precipitado de enzima obtenido (libre de glicerol) se resuspende en buffer de fosfato de potasio pH 6,6 con 0,1 mM de Mn.

Posteriormente se adicionó a un tubo de ensayo 0,5 g de soporte activado y 1,0 ml de la preparación enzimática sin glicerol conteniendo 50, 100, 200, 250, 500, 1000 y 1614 U/ml. Se realizó la reacción de inmovilización a una temperatura de 4,0 °C por un período de 18 horas y se determinó la actividad del biocatalizador obtenido empleando lactosa como sustrato.

## **2.2 ESTABILIDAD DEL BIOCATALIZADOR EN OPERACION SEMI-CONTINUA EN UN REACTOR DE LECHO EMPACADO.**

Con el propósito de evaluar la actividad y estabilidad del biocatalizador en un reactor de lecho empacado se añadieron 350 g (peso húmedo) del biocatalizador en una columna de vidrio de 29,0 X 4,0 cm equipada con una camisa exterior para el control de temperatura. Se utilizó como alimentación, una solución de lactosa al 10% (p/v) en el mismo buffer de fosfato empleado en las determinaciones de actividad enzimática. La alimentación se incorporó al reactor a un flujo de 9,6 ml/min. a una temperatura de 35 °C. La operación se realizó de forma semi-continua con intervalos de reposo donde la columna con la enzima inmovilizada se mantenía a una temperatura de 4 °C.

Para evaluar el % de conversión de la lactosa en glucosa obtenida por la acción hidrolítica de la enzima inmovilizada se determinó el contenido de glucosa del efluente proveniente de la columna empleando el método de Glucosa-Oxidasa Peroxidasa descrito en el informe anterior (Diciembre de 1.990).

### 2.3 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DEL BIOCATALIZADOR SOBRE DIFERENTES SUSTRATOS.

Con el propósito de evaluar la actividad del biocatalizador sobre diferentes sustratos, se estudió la actividad del biocatalizador sobre suero de leche hidrolizado y leche pasteurizada y se comparó con la actividad obtenida al emplear lactosa comercial.

#### 2.3.1 ACTIVIDAD SOBRE SUERO DE LECHE HIDROLIZADO.

La hidrólisis del suero de leche se realizó por medio de tres procedimientos diferentes:

PROCEDIMIENTO A: Se disuelve un peso de suero en polvo que proporcione un 10% de lactosa en agua destilada y se ajusta el pH a un valor de 4,0 empleando para ello una solución de ácido sulfúrico 2N. Posteriormente, la solución ácida obtenida se somete a 250 9F y 15,0 libras de presión durante un periodo de tiempo de 20 minutos. La proteína precipitada se separa por

centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 15 minutos. Finalmente, se ajusta el pH de la solución a 6,6 empleando para ello una solución de hidróxido de sodio 3N y se adiciona la cantidad requerida de los iones Mg y Mn para la actividad de la enzima.

PROCEDIMIENTO B: Se disuelve en agua destilada un peso de suero en polvo que proporcione un 10% (p/v) de lactosa y se ajusta el pH a un valor de 4,0 con una solución de ácido sulfúrico 2N. La precipitación y separación de la proteína del suero se realiza de conformidad a la metodología utilizada en el procedimiento A. Posteriormente se ajusta el pH de la solución a un valor de 6,6 con una solución de hidróxido de sodio 3N y se adiciona EDTA en una relación de 0,2 moles de EDTA por cada mol de calcio presente en el suero de leche hidrolizado. Finalmente se incorporan los iones Mg y Mn con la finalidad de determinar la actividad de la enzima inmovilizada en este sustrato.

PROCEDIMIENTO C: Se procede igual que el procedimiento B hasta la separación de la proteína y posteriormente se adiciona gota a gota una solución de hidróxido de sodio 3N, hasta la obtención de un abundante precipitado blanco. Luego de ello, se centrifuga a 4500 r.p.m. durante 15 minutos y se descarta el precipitado. Finalmente, se ajusta el pH a 6,6 y se adicionan los iones Mg y Mn necesarios para la actividad de la enzima.

### **2.3.2 ACTIVIDAD SOBRE LECHE PASTEURIZADA**

Se determinó la actividad del biocatalizador empleando como sustrato leche pasteurizada con un 6.3 % (p/v) de lactosa sin ningún tipo de aditivo o suplemento. La actividad del biocatalizador se determinó de conformidad a la sección (2.4).

### **2.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.**

La determinación de la actividad de la enzima libre e inmovilizada se realizó cuantificando la glucosa generada a partir de una solución de lactosa empleando para ello el método de Glucosa-Oxidasa Peroxidasa descrito en el informe de Avance previo (Diciembre 1.990).

### **2.5 CARACTERIZACION DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.**

#### **2.5.1 DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.**

En la determinación del pH óptimo de la enzima inmovilizada se evaluó la actividad de un peso de biocatalizador (sección 2.4) bajo diferentes pH de reacción ( 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; y 7,0). Igualmente, para efectos de comparación, se determinó la actividad de la enzima soluble bajo las mismas condiciones de pH.

### 2.5.2 DETERMINACION DE LA TEMPERATURA OPTIMA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.

En la determinación de la temperatura óptima de la enzima inmovilizada, se evaluó la actividad de un peso de biocatalizador bajo diferentes temperaturas de reacción (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 °C). También, se determinó la actividad de la enzima soluble bajo las mismas condiciones de temperatura.

### 2.5.3 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.

Con la finalidad de calcular las constantes de Michaelis-Menten para la hidrólisis de lactosa empleando la enzima inmovilizada, se determinó la velocidad inicial de reacción para diferentes concentraciones de lactosa (0.160, 0.100, 0.040, y 0.025 Molar) en "buffer" fosfato de potasio 0.1 Molar bajo las condiciones de pH y temperatura óptimas establecidas en las Secciones 2.5.1 y 2.5.2. La determinación de la actividad enzimática para cada concentración de sustrato se realizó de conformidad a la metodología descrita en el informe de Avance previo (Diciembre 1.990) y se tomaron muestras de la fracción líquida al cabo de 1,0, 2,0 y 4,0 minutos de reacción.

### 3.RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 DETERMINACION DE LA RELACION OPTIMA ENTRE LA CONCENTRACION DE ENZIMA Y EL PESO DE SOPORTE

En la Figura No 1 se muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la concentración de enzima (empleando un peso constante de soporte) sobre la actividad del biocatalizador. Al analizar los resultados se encontró un valor máximo de 593 Unidades de enzima Inmovilizada por gramo de soporte al utilizar una relación inicial de 2184 Unidades de enzima por gramo en la reacción de inmovilización. Bajo estas condiciones experimentales se obtuvo un valor en el rendimiento de la inmovilización de aproximadamente del 27%.

Illanes A. y col (1990) estudiaron la inmovilización de B-galactosidasa obtenida mediante el cultivo de A. niger sobre quitina y encontraron un valor máximo de 400 Unidades por gramo de soporte y un rendimiento en la inmovilización del 33% al emplear una relación enzima-soporte de 1200 Unidades por gramo de quitina activada.

Por otra parte, se pudo observar que el glicerol tiene un efecto estimulante sobre la expresión de la actividad del biocatalizador obtenido. Efectivamente se encontró que la remoción del glicerol del extracto enzimático disminuye en un

EFEECTO DE LA CON. DE ENZIMA USANDO UN PESO CTE.

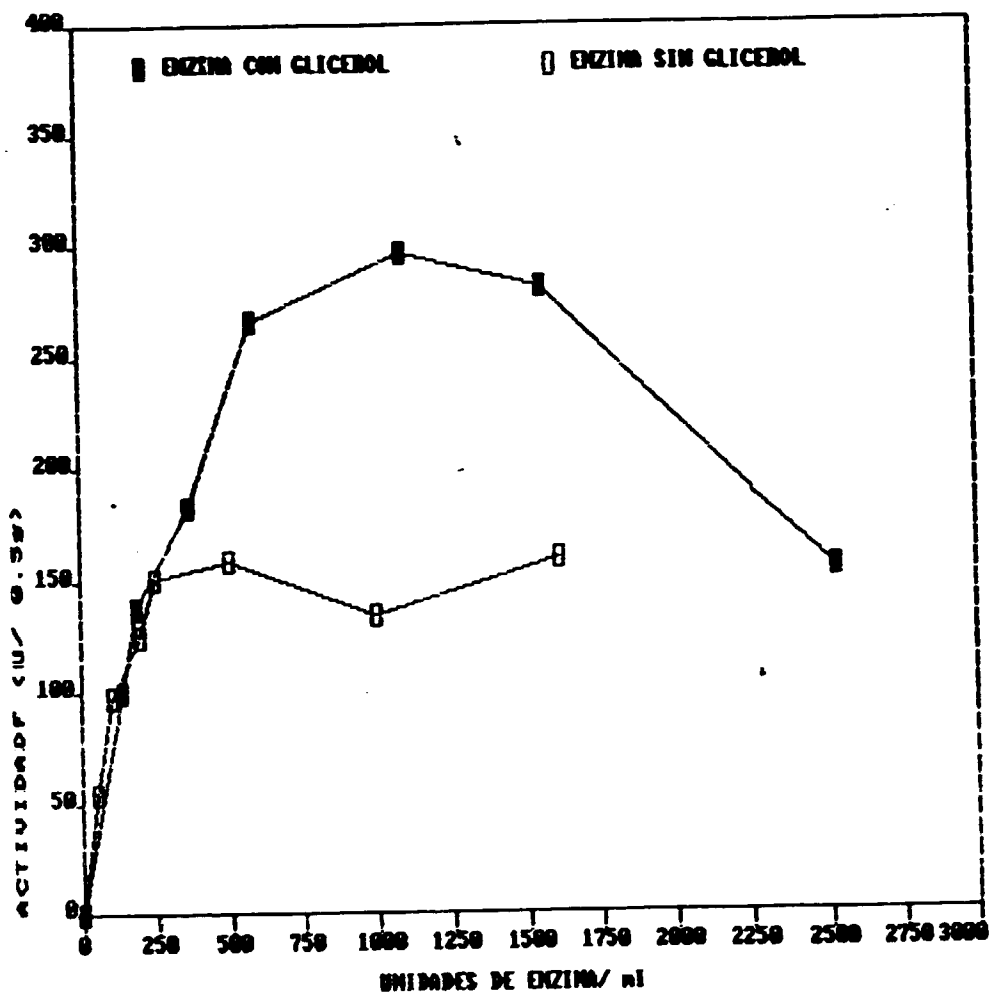


FIG. 1

50% la actividad de la enzima inmovilizada, alcanzandose sólo un valor máximo de 300 Unidades por gramo de soporte.

En la Figura No 2 se observa que los valores obtenidos en el rendimiento de la inmovilización son similares independientemente si la solución de enzima presenta o no glicerol en su composición. Efectivamente, a pesar de observar una reducción del 50% en la actividad expresada al emplear la enzima sin glicerol no se observa para ésta preparación una reducción equivalente en el rendimiento de la inmovilización. Esto sugiere que aunque la cantidad de enzima fija al soporte es aproximadamente la misma (al emplear la enzima con o sin glicerol) parte de ésta posiblemente adquiera una configuración inactiva cuando se remueve el glicerol del extracto enzimático (Informe de Avance Abril de 1.990, sección 2.2).

Los resultados indican que es necesario mejorar aún más la calidad del biocatalizador no sólo en términos de la cantidad de enzima inmovilizada por gramo de soporte si no también en relación a el rendimiento de inmovilización obtenido en la operación.

### 3.2 ESTABILIDAD DEL BIOCATALIZADOR EN OPERACION SEMI-CONTINUA EN REACTOR DE LECHO EMPACADO.

Los resultados obtenidos en el estudio de la estabilidad



del biocatalizador a nivel de un reactor de lecho empacado se muestran en la figura No 3. Se puede observar que el % de conversión del sustrato se mantiene estable en el tiempo alcanzando un valor de aproximadamente 95% a los 36 días de funcionamiento semi-continuo. Es interesante mencionar que el alto % de conversión se obtuvo utilizando una tasa de flujo también elevada de 576 ml /hora y a una temperatura de 350 C.

Illanes A. y col (1990) Al estudiar la estabilidad de una preparación de  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada sobre quitina en un reactor de lecho empacado, encontró un valor promedio de 85% de conversión del sustrato a los 15 días de funcionamiento continuo. En el experimento los autores emplearon una alimentación de permeado de suero (con un 3,7% de lactosa) a un flujo de 72 ml/h y a una temperatura de 400C.

Los resultados obtenidos en cuanto a la estabilidad del biocatalizador son prometedores si se considera el % de conversión obtenido para el elevado flujo utilizado en la realización del experimento. Es necesario realizar en un futuro experiencias similares pero empleando suero de leche hidrolizado como alimentación y un sistema que permita la incorporación continua sin interrupciones del sustrato. Estos experimentos permitirán evaluar de manera mas acertada el posible escalamiento del proceso y su factibilidad económica.

VARIACION DEL RENDIMIENTO A DIF. RELACIONES E/S

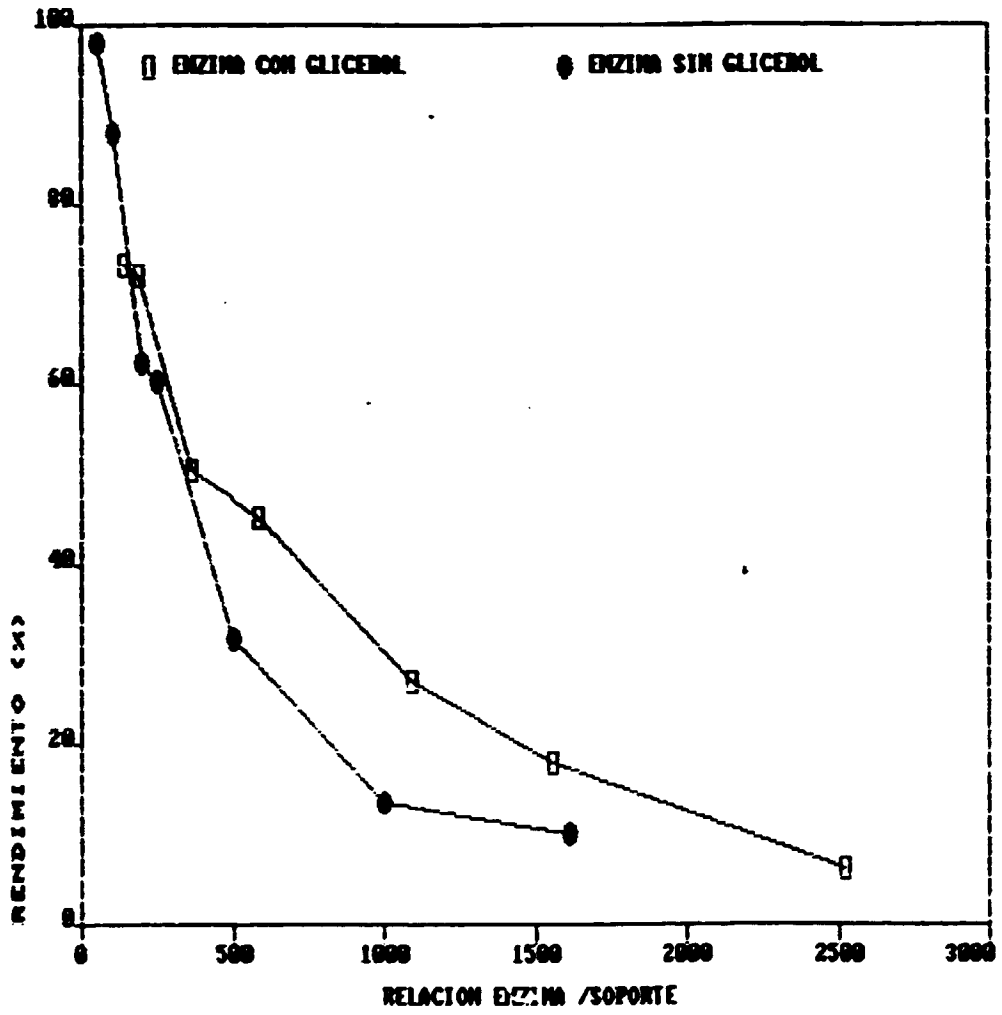
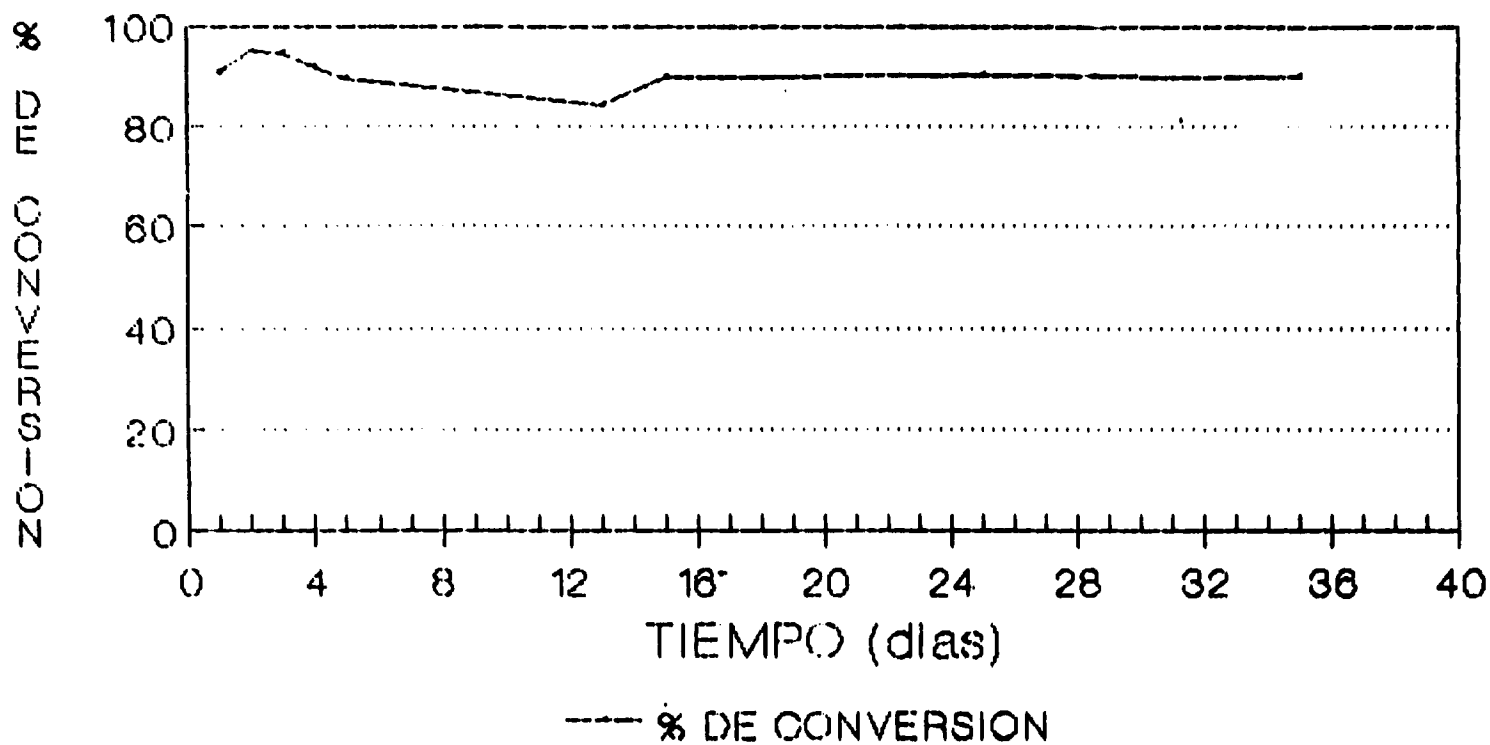


FIG 2.

# ESTABILIDAD DEL BIOCATALIZADOR A NIVEL DE REACTOR DE LECHO EMPACADO



EMPLEANDO 35 °C, 10% (p/v) LACTOSA  
Y FLUJO DE 9,8 ml/min.

FIG. 3

### 3.3 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DEL BIOCATALIZADOR SOBRE SUERO DE LECHE HIDROLIZADO.

#### 3.3.1 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD EMPLEANDO SUERO DE LECHE HIDROLIZADO.

En la figura No 4 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la actividad de la enzima sobre suero de leche hidrolizado. Al analizar los valores de actividad relativa, puede observarse que en términos generales la actividad expresada del biocatalizador sobre suero de leche es menor a la obtenida empleando lactosa comercial como sustrato. Esto indica que existe en el suero hidrolizado elementos o compuestos que afectan la actividad de la enzima. Por otra parte la adición de EDTA (procedimiento utilizado en la elaboración del suero hidrolizado B) no mejoró la actividad expresada. Efectivamente, al incorporar EDTA a la solución de suero sólo se alcanzó un valor de 11.3% en la actividad relativa. Posiblemente al adicionar EDTA (compuesto quelante) se disminuyó el contenido libre de los iones Mg y Mn en solución afectando la actividad enzimática.

Al emplear el suero hidrolizado obtenido mediante el procedimiento C (suero C), se obtuvo un incremento en la actividad expresada por el biocatalizador alcanzando un valor máximo de 44.9 %. Los resultados indican que es necesario mejorar la remoción de proteínas y otros compuestos presentes en el suero

# ACTIVIDAD DEL BIOCATALIZADOR AL EMPLEAR SUERO DE LECHE HIDROLIZADO COMO SUSTRATO

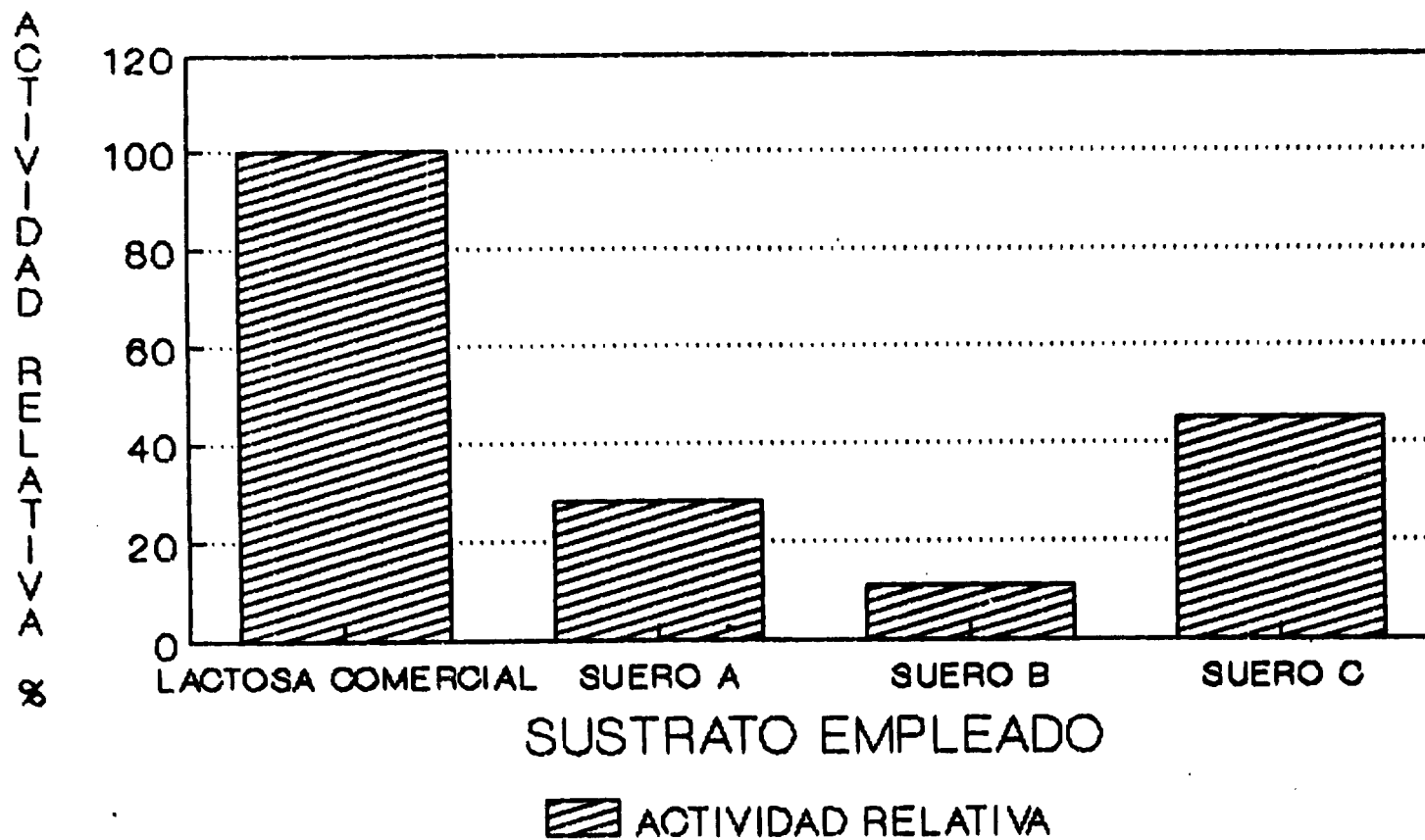


FIG. 4

hidrolizado de leche. Estos compuestos aparentemente interfieren en la expresión de la actividad del biocatalizador.

### **3.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL BIOCATALIZADOR SOBRE LECHE PASTEURIZADA.**

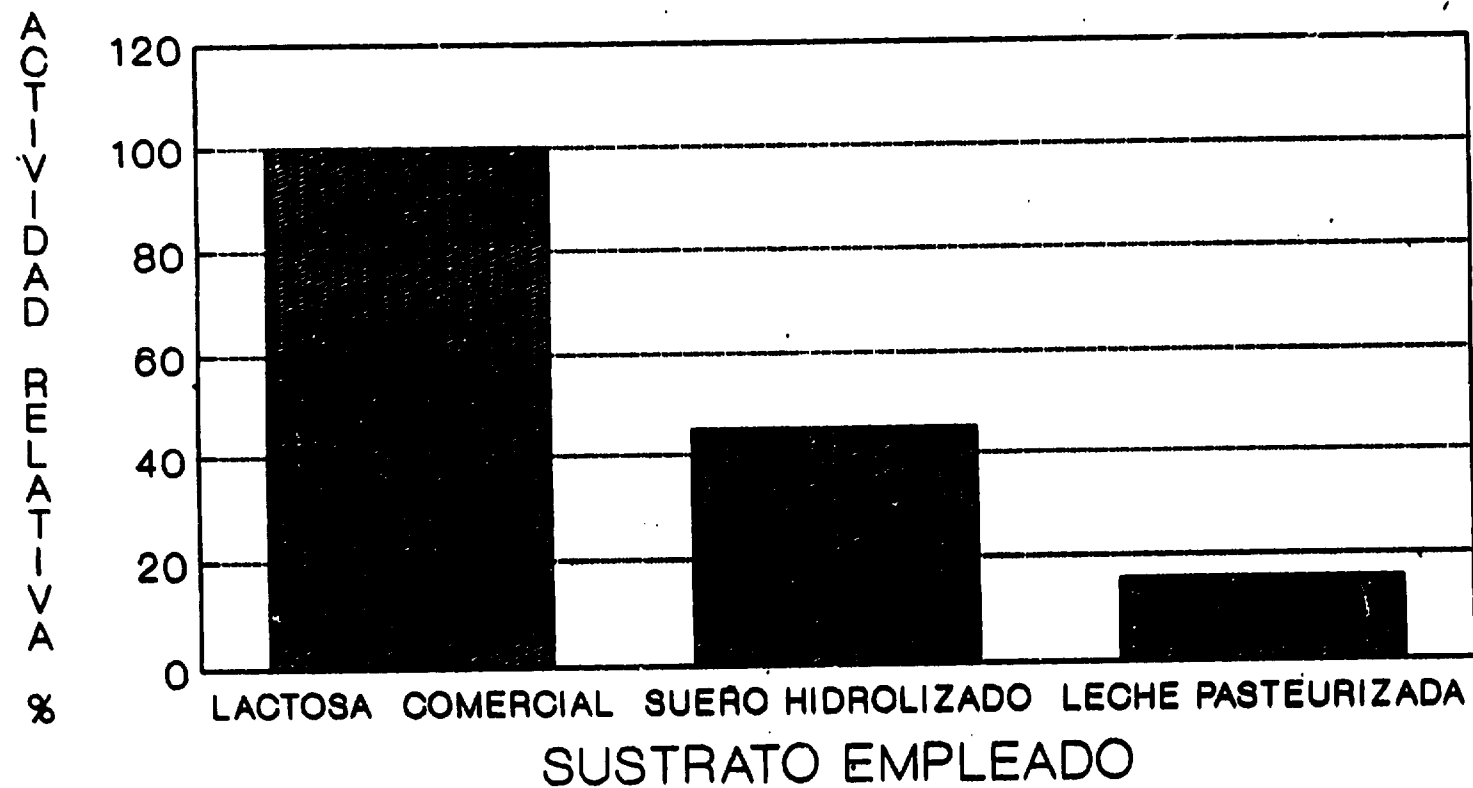
En la Figura No 5 se presentan los resultados preliminares obtenidos al emplear leche pasteurizada con un contenido de lactosa del 6.3% como sustrato. Si bien el % de actividad relativa es bajo ( 15.5%) debe considerarse que el tiempo de contacto sustrato-biocatalizador es de apenas 4 minutos. La completa degradación de la lactosa presente en la leche pasteurizada puede realizarse si se emplean tiempos de contacto mayores.

### **3.5 CARACTERIZACION DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.**

#### **3.5.1 DETERMINACION DEL pH Y TEMPERATURA OPTIMA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.**

Al evaluar el pH y temperatura óptima de la enzima inmovilizada se encontró que el biocatalizador presenta una actividad máxima a un pH de 6,0 y a una temperatura de 35 °C. (Figura No 6 y 7 ). Si se compara los valores óptimos de pH y temperatura de la enzima inmovilizada y la enzima libre (enzima en solución) puede observarse que la enzima inmovilizada adquiere

# ACTIVIDAD DEL BIOCATALIZADOR EMPLEANDO DIFERENTES SUSTRATOS



LACTOSA COMERCIAL (10%) ,SUERO DE LECHE  
HIDROLIZADO (10% DE LACTOSA) Y LECHE  
PASTEURIZADA (6.8% DE LACTOSA)

FIG. 5

# EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA.

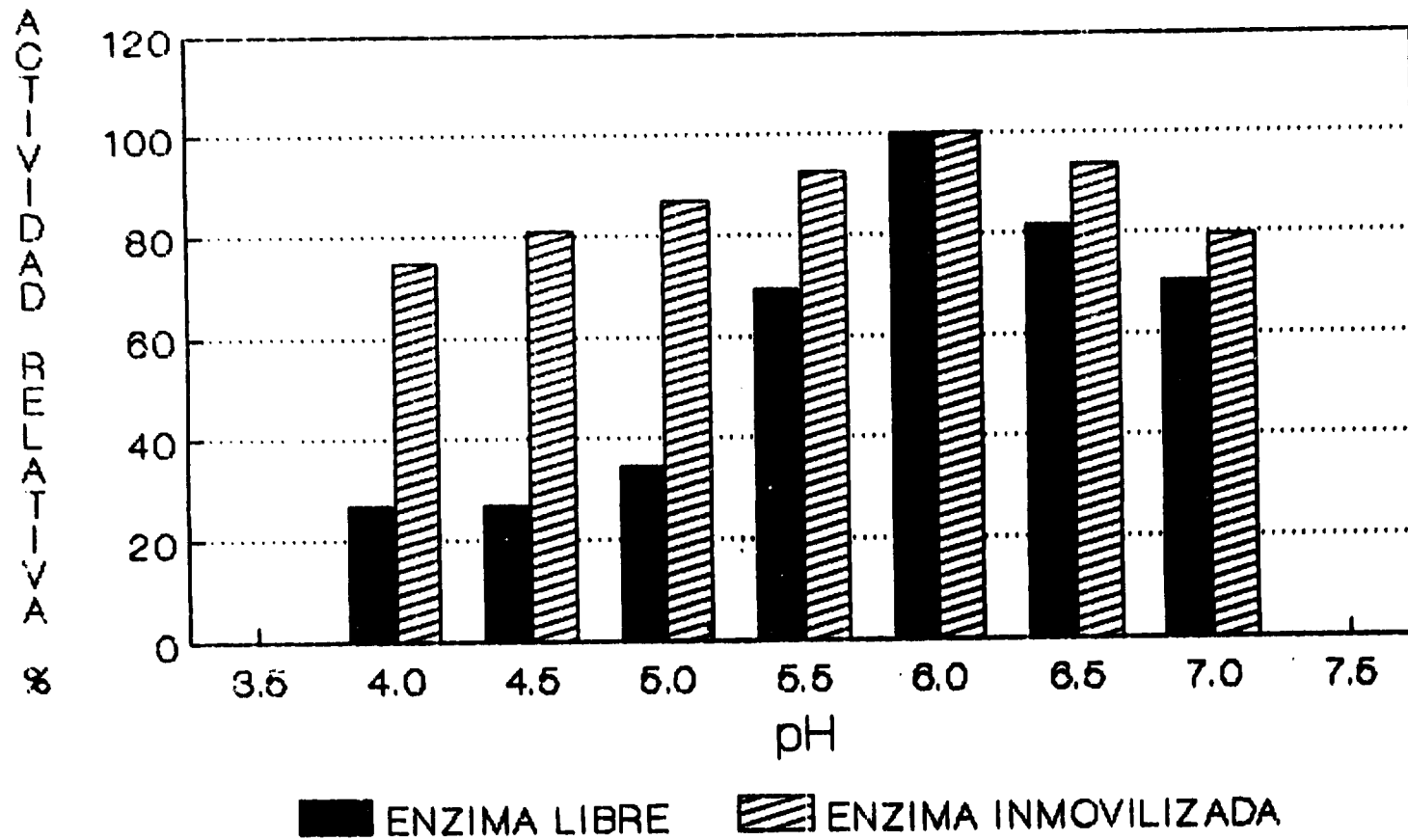


FIG. 6



# EFEECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA

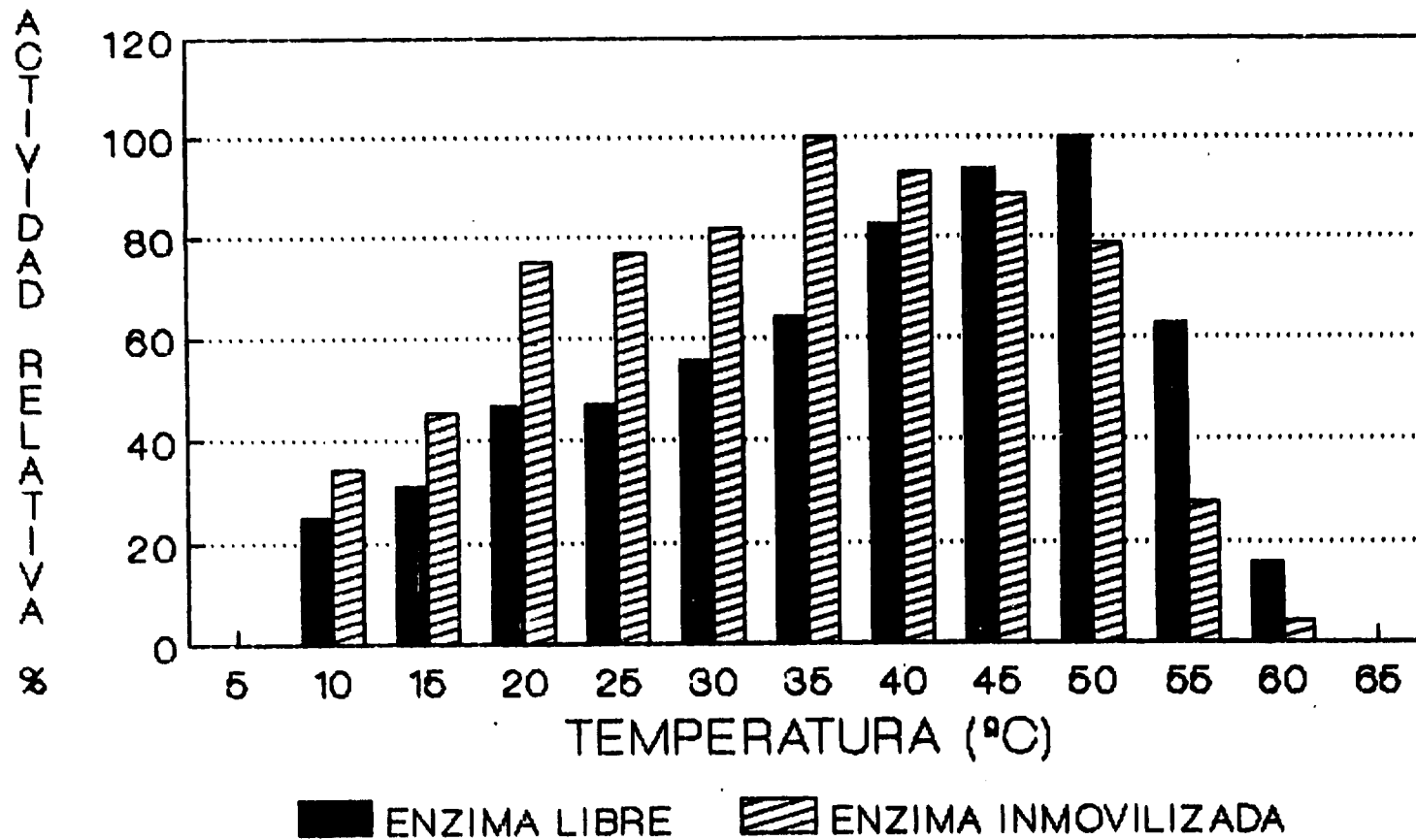


FIG. 7

una mayor estabilidad a los cambios de pH (Figura No 6 ) y presenta una actividad superior a temperaturas inferiores a los 35 °C.

Roodpeyma, S. y col. (1983) al caracterizar la enzima lactasa obtenida a partir del cultivo de A. niger inmovilizada en alúmina encontraron que la enzima inmovilizada presentaba un pH óptimo de 3,5 mientras que el pH de máxima actividad de la enzima en solución era de 4,6. Igualmente observaron diferencias en cuanto a la temperatura óptima de la enzima libre e inmovilizada obteniendo valores de 50 y 65 °C respectivamente.

### 3.5.2 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.

Al evaluar los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  de la enzima inmovilizada se encontró que el biocatalizador presenta un valor de  $K_m$  de 0,1244 M y una  $V_{max}$  de 16,45  $\mu\text{mol}$  de glucosa/minuto x gramo (Figuras No 8,9,10 y 11). El valor de  $V_{max}$  obtenido es superior al observado por Roodpeyma S. y col (1983). Estos autores al estudiar los parámetros cinéticos de la enzima B-galactosidasa inmovilizada en alúmina encontraron un valor de  $V_{max}$  de 7,85  $\mu\text{mol}$  de glucosa /minuto x gramo y un  $K_m$  de 0,263 M. Los resultados indican que el biocatalizador obtenido por nosotros en el Laboratorio presenta una mayor afinidad por el sustrato ya que requiere una menor cantidad de sustrato para

# DETERMINACION DE LA VELOCIDAD INICIAL DE REACCION EMPLEANDO LA ENZIMA INMOVILIZADA.

CONCENTRACION DE GLUCOSA (mmol/l)

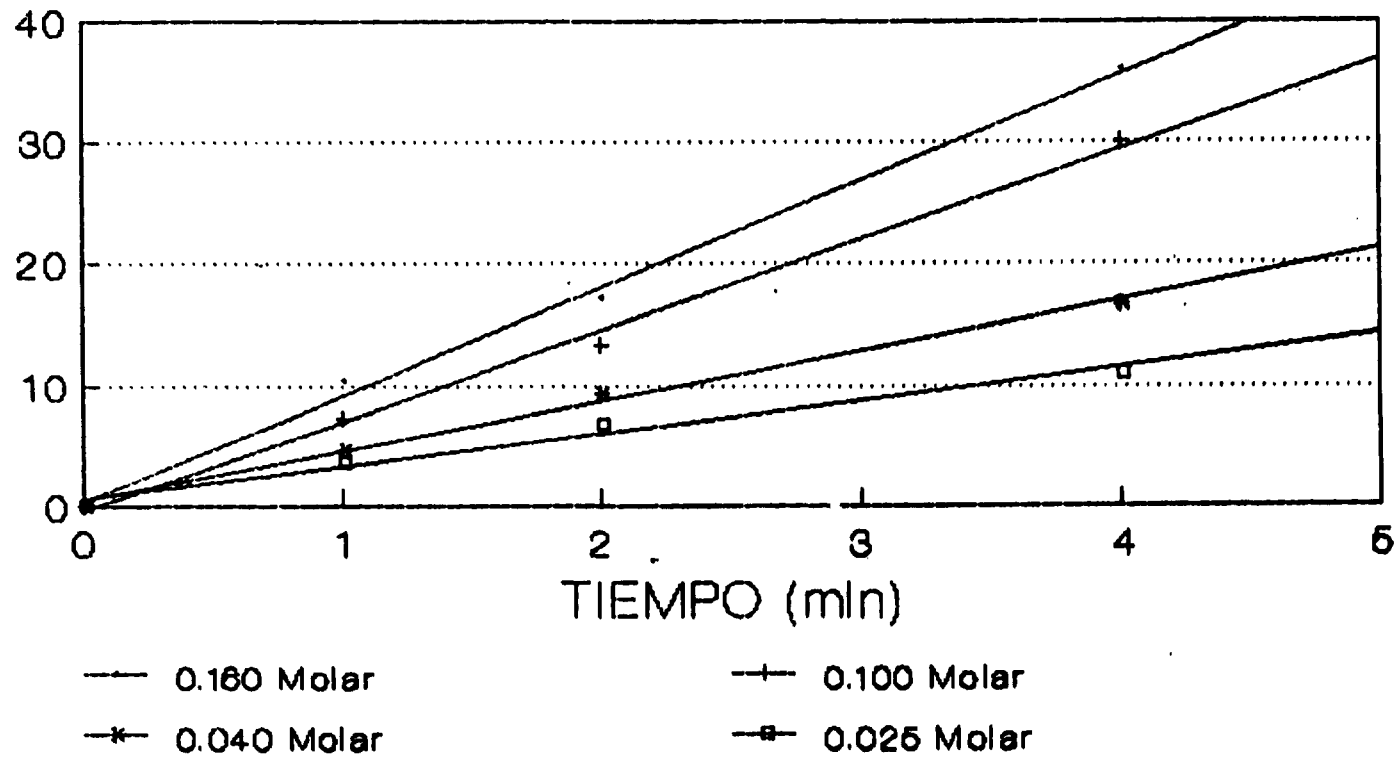


FIG. 8

CINETICA DE LA ENZIMA INMOBILIZADA

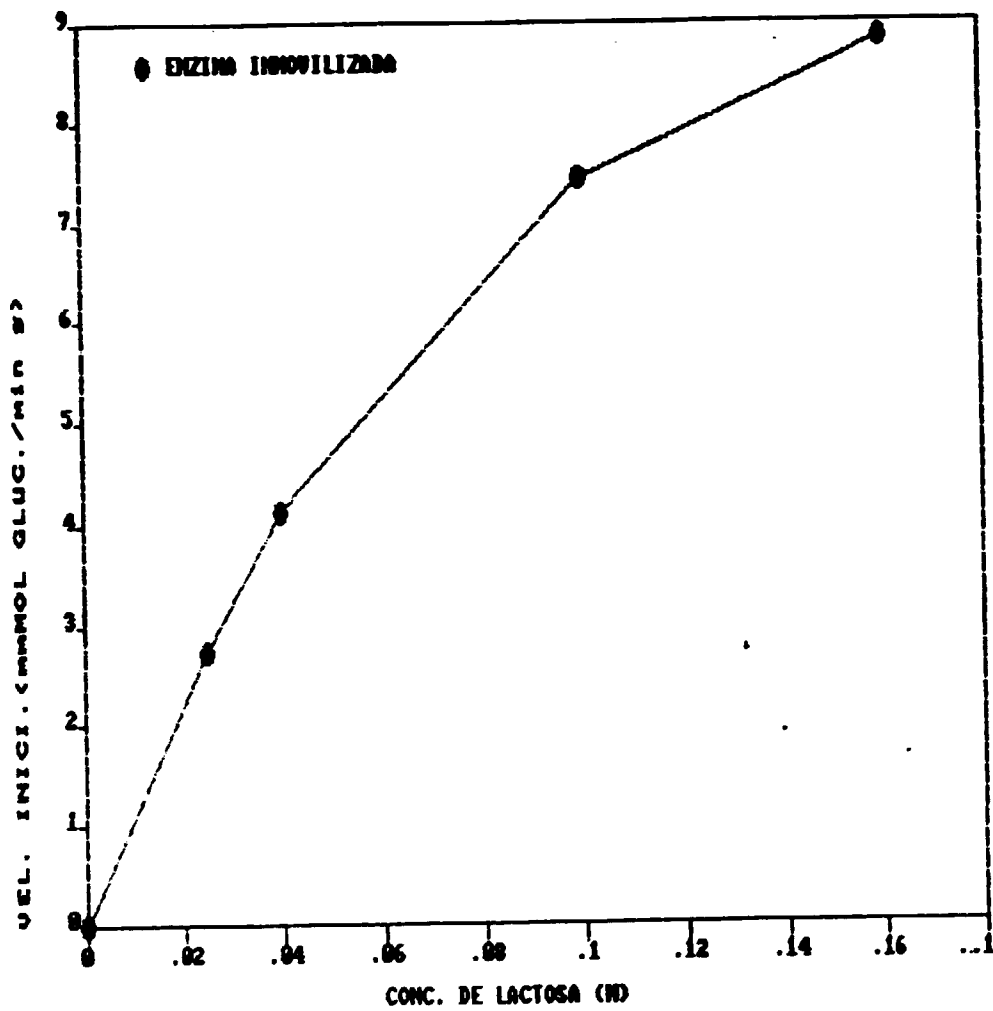
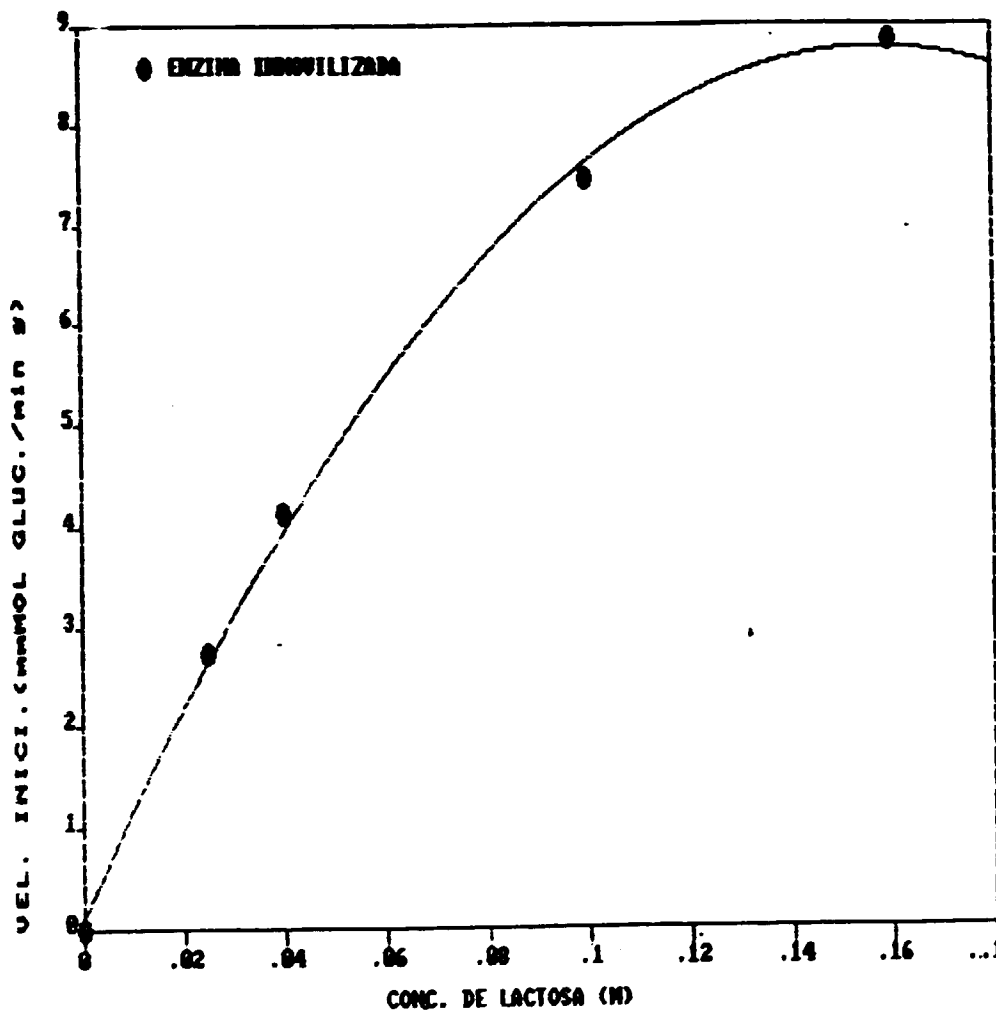


FIG. 9

CINETICA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA



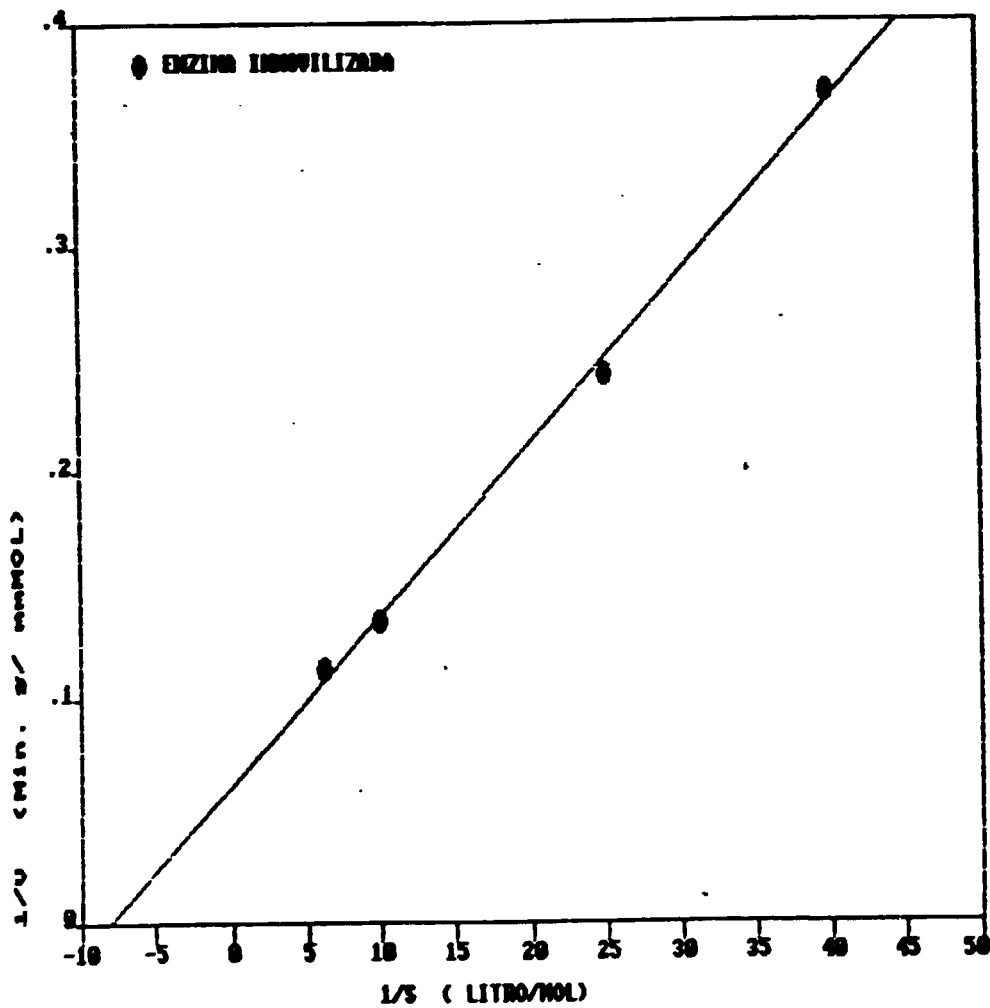
THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$( 1.223E-01) + ( 1.976E+01)*X + (-1.128E+01)*X^2$$

THE VARIANCE - 1.700E-02

FIG. 10

GRAFICO DE LINDEWEYER-BIER



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$( 6.079E-02) + ( 7.561E-03)*X$$

THE VARIANCE - 2.839E-05

FIG. 11

alcanzar la mitad de la velocidad máxima de reacción.

#### 4. CONCLUSIONES

1. Al inmovilizar  $\beta$ -Galactosidasa en derivado vidrio-titanio empleando una relación de 2184 Unidades por gramo en la reacción de inmovilización, se obtiene un máximo de 593 Unidades de enzima inmovilizada por gramo de soporte.

2.- Los resultados obtenidos en cuanto a la estabilidad del biocatalizador muestran un porcentaje de conversión del 95% al cabo de 35 días de funcionamiento semicontínuo.

3.- La disminución de la actividad enzimática de la enzima inmovilizada al emplear suero hidrolizado de leche y leche pasteurizada, aparentemente sugiere la necesidad de remover las proteínas y otros compuestos presentes en este tipo de sustrato.

4.- En la caracterización de la enzima inmovilizada, se encontró que el biocatalizador presenta un máximo de actividad a un pH de 6,0; y a una temperatura de 35 °C. Igualmente, el biocatalizador presenta un  $K_m$  de 0,1244, una  $V_{max}$  de 16,45  $\mu\text{mol}$  de glucosa/min  $\times$  . g.



## BIBLIOGRAFIA

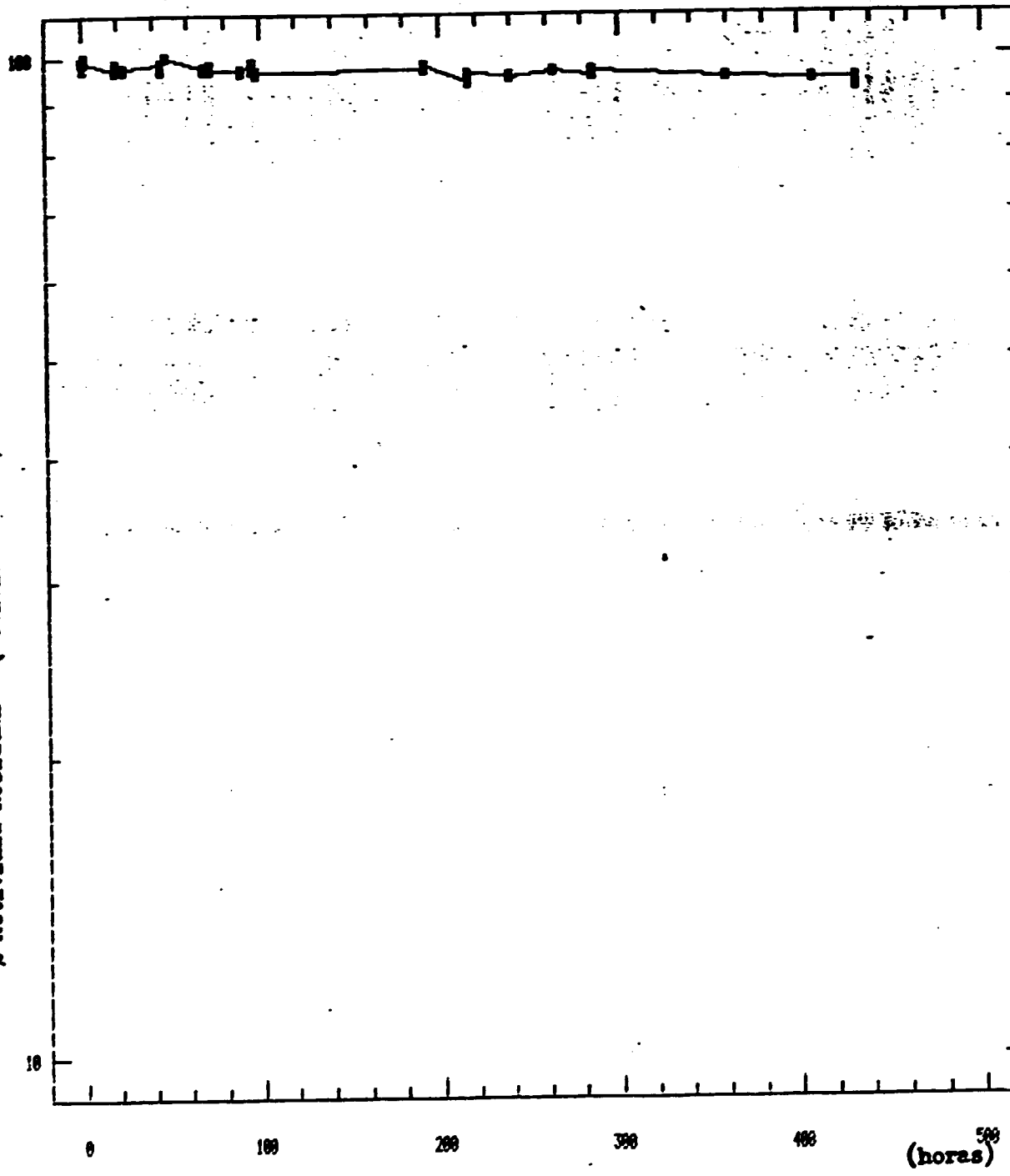
1.- Illanes, A.; Zuñiga, E. y Luis, A. (1990). Inmovilización de Lactasa microbiana. Arch. Biol. Med. 23: 159-164.

2.- Roodpeyma, S.; Hill, C. y Amundson, C. (1983). Use of immobilized Lactase in processing cheese Whey ultrafiltrated. Journal of Food Proccess Engineering, 6: 113-134.

ANEXO

Plot of LACTASA.ESTOP vs LACTASA.TIEMPO4

LACTASA.ESTOP  
% Actividad Residual = (Actividad Final/ Actividad Inicial) X 100



LACTASA.TIEMPO4

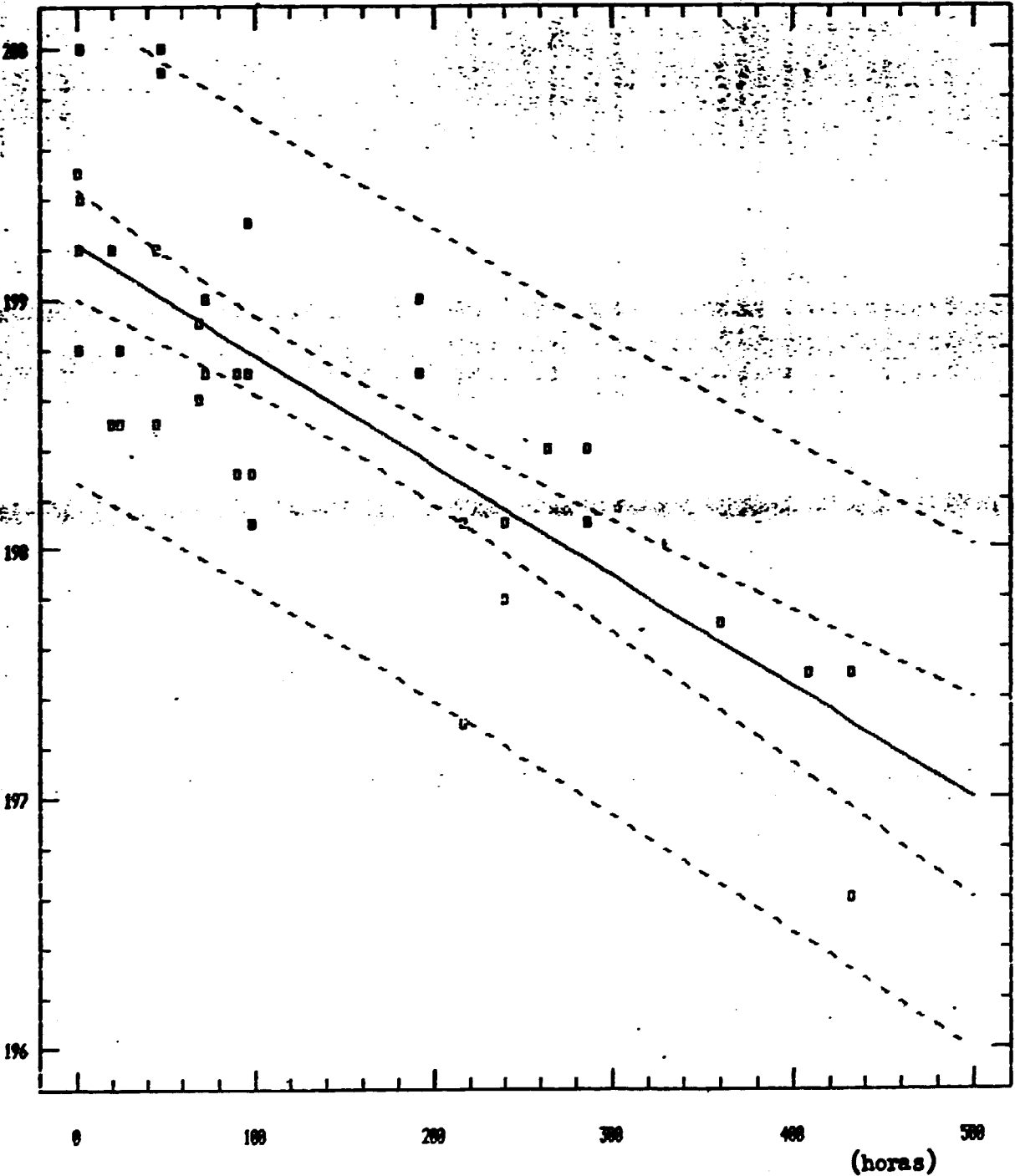
ESTABILIDAD OPERACIONAL DE LA ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE VIDRIO

Regression of LACTASA. ESTOP2 on LACTASA. TIEMPO4

(C.E.M.)

LACTASA. ESTOP2

Log 5 Actividad Residual



LACTASA. TIEMPO4

Regression Analysis - Linear model:  $Y = a + bX$

Dependent variable: LACTASA.ESTOP2

Independent variable: LACTASA.

Parameter	Estimate	Standard Error	T Value	Prob. Level
Intercept	1.99215	1.0646E-3	1871.26	.00000
Slope	-4.42511E-5	5.26595E-6	-8.40325	.00000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	Prob. Level
Model	.001483	1	.001483	70.61461	.00000
Error	.000798	38	.000021		

Total (Corr.) .002282 39

Correlation Coefficient = -0.806312  
 Std. Error of Est. = 4.58327E-3

R-squared = 65.01 percent

ESTABILIDAD OPERATIVA

Expresado como log (% Actividad Residual) vs. tiempo

% Actividad Residual = (actividad final / actividad inicial) x 100

ECUACION DE LA RECTA:  $Y = -4,42511 \times 10^{-5}X + 1,99215$

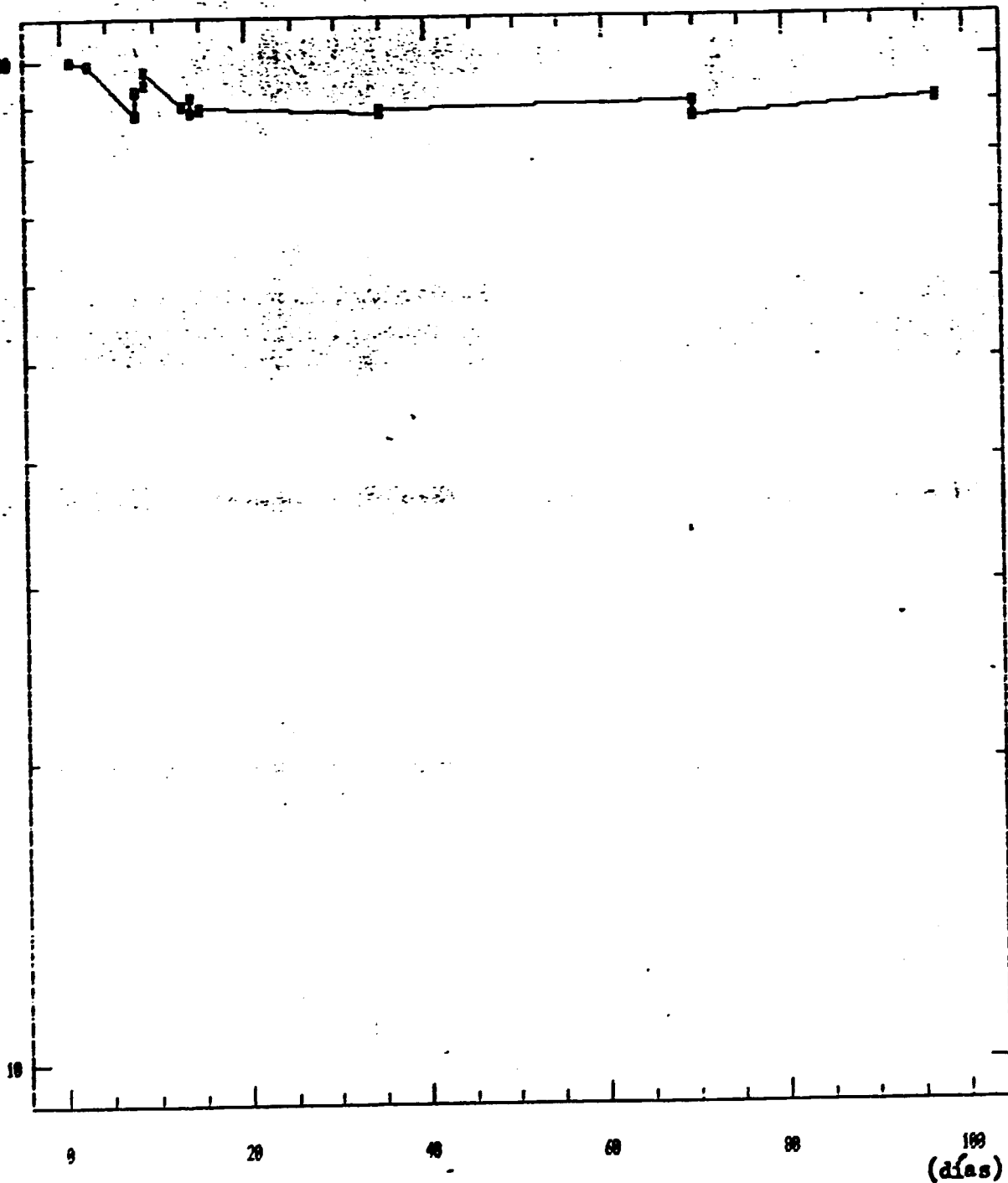
siendo Y = log (%Actividad Residual) y X= tiempo (horas)

TIEMPO DE VIDA MEDIO = 276 días (substrato: lactosa)

Plot of LACTASA. ESTALM2 vs LACTASA. TIEMPO2

# LACTASA. ESTALM2

% Actividad Residual = (Actividad Final / Actividad inicial) x 100



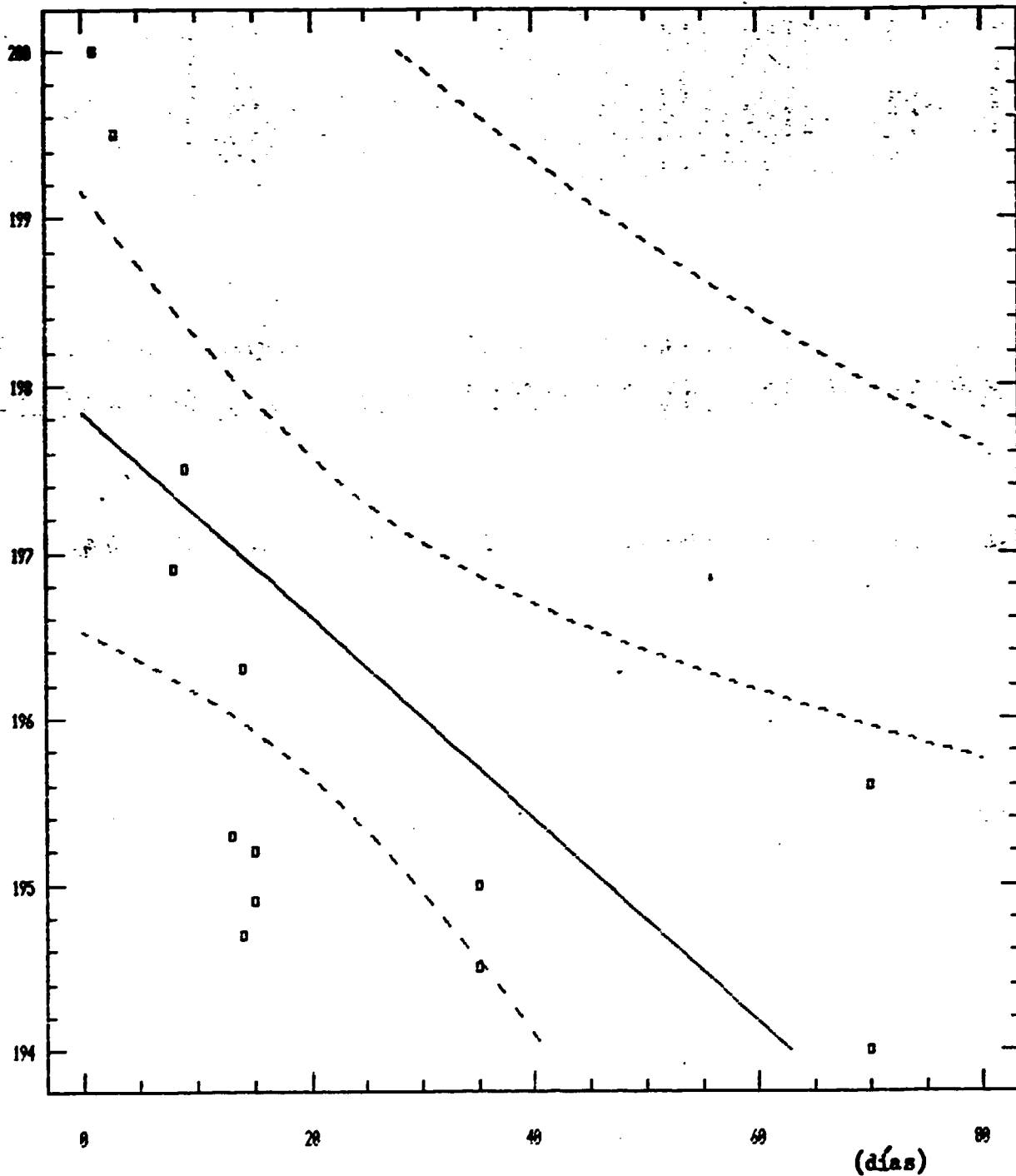
# LACTASA. TIEMPO2

ESTABILIDAD BAJO ALMACENAMIENTO (02-52 C, Buffer Fosfato 0,1 M) DE LA

Regression of LACTASA. ESTAD on LACTASA. TIEMPO2

(X 0.01)

LACTASA. ESTAD  
Log % Actividad Residual



LACTASA. TIEMPO2

ESTABILIDAD BAJO ALMACENAMIENTO DE LA ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE VIDRIO

Regression Analysis - Linear model:  $Y = a + bX$

Dependent variable: LACTASA.ETA AL      Independent variable: LACTASA.TIE

Parameter	Estimate	Standard Error	T Value	Prob. Level
Intercept	1.9784	6.11281E-3	323.648	.00000
Slope	-6.11059E-4	2.04321E-4	-2.99068	.01042

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	Prob. Level
Model	.0026823	1	.0026823	8.944148	.01042
Error	.003899	13	.000300		
Total (Corr.)	.006581	14			

Correlation Coefficient = -0.638425      R-squared = 40.76 percent  
Std. Error of Est. = 0.0173175

ESTABILIDAD BAJO ALMACENAMIENTO:

Expresado como log (% Actividad Residual) vs. tiempo  
% Actividad Residual = (actividad final / actividad inicial) x 100

ECUACION DE LA RECTA:  $Y = - 6,11059 \times 10^{-4} X + 1,9784$

siendo Y = log(% Actividad Residual) y X= tiempo (días)

TIEMPO DE VIDA MEDIO = 457 días aprox. (Substrato: Lactosa)