



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

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



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

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

FAIR USE POLICY

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

CONTACT

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

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

19489

88P
traces
copy to
diagram

PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA
AMERICA LATINA Y EL CARIBE

PROYECTO: DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA OBTENCIÓN DE
BETAGALACTOSIDASA

PRESENTADO POR:

Livio Revel-Chion, Ph.D. (Coordinador)
Lic. Néstor González
Lic. Carlos Rocha, M.Sc.
Dr. Marco González

Caracas, Abril 1990

SUMARIO

En este documento se presentan los resultados obtenidos durante la primera parte del período correspondiente al segundo año del contrato firmado con la ONUDI en noviembre de 1989, para el desarrollo de una tecnología que permita la obtención de una enzima que hidrolice la lactosa de la leche y el suero.

El contenido del informe se ha dividido en tres partes, a saber:

- 1.-Optimización del medio de crecimiento y determinación de las constantes cinéticas del cultivo (K_s , μ_{max}) de *Kluyveromyces fragilis*, en cultivos por carga.
- 2.-Inmovilización β -galactosidasa comercial ("Lactozym") en nylon.
- 3.-Caracterización de la β -galactosidasa comercial ("Lactozym") y la producida por *Kluyveromyces fragilis*.

La primera sección arriba indicada, fué necesaria para poder planificar los experimentos de fermentación continua previstos en el contrato, y que no se han ejecutado para esta fecha, dado que no se ha recibido aún el equipo necesario, a pesar de haberlo ordenado a finales de 1989. Dentro de los resultados obtenidos, destacan los relativos a la optimización del medio de cultivo, tomando en consideración las disponibilidades en el mercado venezolano. En ellos se demuestra, que es posible la sustitución de la lactosa (de origen comercial) y el extracto de levadura, por suero de leche hidrolizado y licor de remojado de maíz, con la finalidad de disminuir los costos de formulación del medio de cultivo.

En la segunda parte, se presentan los resultados obtenidos en la inmovilización de la enzima comercial Lactozym (suministrada por la empresa NOVO Enzyme) sobre nylon. Estos experimentos fueron necesarios, dado que se requiere comparar la actividad y estabilidad de la enzima inmovilizada de origen comercial con la enzima inmovilizada, proveniente del cultivo de *Kluyveromyces fragilis*. Esta comparación se hace necesaria para determinar la influencia de los costos de producción, inmovilización y viabilidad del catalizador biológico obtenido. Cabe destacar que el tiempo de vida medio de la preparación, en almacenamiento con reutilizaciones sucesivas, fué de aproximadamente cuatro días para uno de los tipos de preparación obtenidos.

En la tercera sección se comparan las constantes cinéticas (K_m , V_{max}) de las enzimas solubles, así como sus energías de activación, pH y temperatura óptimas de operación; parámetros que es necesario comparar con los correspondientes a las preparaciones inmovilizadas.

OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CRECIMIENTO Y DETERMINACION DE LAS
CONSTANTES CINETICAS K_s Y μ_{max} DE *Kluveromyces fragilis*.

INDICE

INDICE DE TABLAS.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	II
1. INTRODUCCION.....	1
2. MATERIALES Y METODOS.....	2
2.1 MATERIAS PRIMAS EMPLEADAS EN LOS EXPERIMENTOS.....	2
2.2 ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA.....	2
2.2.1 DETERMINACION DE LA COMPOSICION DEL SUERO DE LECHE.....	2
2.2.1.1 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE LACTOSA.....	2
2.2.1.2 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE PROTEINA SOLUBLE.....	3
2.2.1.3 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD.....	3
2.2.1.4 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CENIZAS.....	3
2.2.1.5 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE Na, K Y Ca.....	4
2.2.2 ANALISIS EFECTUADOS AL LICOR DE REMOJADO MAIZ.....	4
2.2.2.1 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE NITROGENO.....	4
2.2.2.2 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE FOSFORO.....	5
2.2.2.3 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE AZUCARES TOTALES.....	7

2.2.2.4 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE AZUCARES REDUCTORES.....	8
2.2.2.5 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD.....	8
2.2.2.6 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CENIZAS.....	8
2.3 HIDROLISIS Y SEPARACION DE PROTEINAS DEL SUERO DE LECHE.....	9
2.4 EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	9
2.4.1 CRECIMIENTO A NIVEL DE FERMENTADOR DE 7 LITROS EMPLEANDO COMO FUENTE DE LACTOSA SUERO DE LECHE EN POLVO AL 5% (P/V).....	9
2.4.2 OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE B-GALACTOSIDASA.....	10
2.4.2.1 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUSTITUCION DE LACTOSA POR SUERO DE LECHE HIDROLIZADO.....	11
2.4.2.2 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUSTITUCION DEL EXTRACTO DE LEVADURA Y EL SULFATO DE AMONIO POR LICOR DE REMUJADO DE MAIZ.....	11
2.4.3 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS DE <i>K. fragilis</i> EMPLEANDO LACTOSA COMO FUENTE DE CARBONO.....	11

2.4.3.1 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS EN EL MEDIO DE REFERENCIA.....	12
2.4.3.1 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS EN EL MEDIO FORMULADO No 10.....	14
3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	15
3.1 COMPOSICION DE LA MATERIA PRIMA.....	15
3.2 CRECIMIENTO DE <i>K. fragilis</i> EN FERMENTADOR DE 7 LITROS EMPLEANDO COMO FUENTE DE LACTOSA SUERO DE LECHE EN POLVO.....	15
3.3 OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA REDUCCION DE β -GALACTOSIDASA.....	23
3.3.1 EFECTO DE LA SUSTITUCION DE LACTOSA POR SUERO DE LECHE HIDROLIZADO.....	23
3.3.2 EFECTO DE LA SUSTITUCION DEL EXTRACTO DE LEVADURA Y EL SULFATO DE AMONIO POR LICOR DE REMJADO DE MAIZ.....	31
3.4 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS K_S Y μ_{max} DE <i>K. fragilis</i>	34
3.4.1 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS DE LA LEVADURA EN EL MEDIO DE REFERENCIA.....	34
3.4.2 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS DE LA LEVADURA EN EL MEDIO FORMULADO No 10.....	38
4. CONCLUSIONES.....	43
APENDICE A.....	

INDICE DE TABLAS

No DE TABLA	TITULO	PAGINA
1	COMPOSICION DE LA MATERIA PRIMA.....	16
2	COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	24
3	COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO (CONTINUACION).....	25

INDICE DE FIGURAS

No DE FIGURA	TITULO	PAGINA
1a	COMPOSICION DEL SUERO DE LECHE EN POLVO.....	17
1b	COMPOSICION DEL LICOR DE REMOJADO DE MAIZ.....	18
1c	CRECIMIENTO DE <i>K. fragilis</i> EN FERMENTADOR DE 7 LITROS CON 5% DE LACTOSA COMERCIAL.....	19
2	CRECIMIENTO DE <i>K. fragilis</i> EN FERMENTADOR DE 7 LITROS CON 5% DE SUERO DE LECHE EN POLVO.....	20
3	CRECIMIENTO DE <i>K. fragilis</i> EN FERMENTADOR DE 7 LITROS AL UTILIZAR 5% DE LACTOSA COMERCIAL (ACTIVIDAD ENZIMATICA).....	21
4	CRECIMIENTO DE <i>K. fragilis</i> EN FERMENTADOR DE 7 LITROS CON 5% DE SUERO DE LECHE EN POLVO (ACTIVIDAD ENZIMATICA).....	22
5	ACTIVIDAD LACTASICA POR GRAMO DE CELULSA.....	27
6	BIOMASA.....	29
7	ACTIVIDAD LACTASICA POR LITRO DE CULTIVO.....	30

8	CINETICAS DE CRECIMIENTO PARA K. fragilis EMPLEANDO LACTOSA COMERCIAL.....	35
9	EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE LACTOSA SOBRE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO.....	36
10	K_s Y μ_{max} PARA K. fragilis EMPLEANDO EL MEDIO DE REFERENCIA.....	37
11	CINETICAS DE CRECIMIENTO PARA K. fragilis EMPLEANDO SUERO DE LECHE HIDROLIZADO.....	39
12	EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE LACTOSA SOBRE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO.....	40
13	K_s Y μ_{max} PARA K. fragilis EMPLEANDO SUERO DE LECHE HIDROLIZADO.....	41

1-.INTRODUCCION

Esta sección contiene los resultados relativos a la determinación de las constantes cinéticas del cultivo. Las experiencias fueron necesarias para poder planificar los experimentos de fermentación continua previstos en el contrato, y que no se han ejecutado para esta fecha, dado que no se ha recibido aún el equipo necesario, a pesar de haberlo ordenado a finales de 1989. Dentro de los resultados obtenidos, destacan los relativos a la optimización del medio de cultivo, tomando en consideración las disponibilidades en el mercado venezolano. En ellos se demuestra, que es posible la sustitución de la lactosa (de origen comercial) y el extracto de levadura, por suero de leche hidrolizado y licor de remojado de maíz, con la finalidad de disminuir los costos de formulación del medio de cultivo.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIAS PRIMAS EMPLEADAS EN LOS EXPERIMENTOS.

Se utilizó como fuente de lactosa suero de leche suministrado por Industrias Lácteas, Torondoy C. A. y como fuente de nitrógeno, licor de remojado de Maíz suministrado por Alfonso Rivas & Cia. C.A..

2.2 ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA.

2.2.1 DETERMINACION DE LA COMPOSICION DEL SUERO DE LECHE.

Con el proposito de conocer la composición del suero de leche empleado en los experimentos se determinó el contenido de lactosa, proteína soluble, humedad, cenizas y la presencia de elementos de Na, K, y Ca.

2.2.1.1 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE LACTOSA.

El contenido de lactosa del suero de leche se determinó mediante el método del ácido Dinitrosalicílico (DNS), detallado previamente en el informe de avance No 1.

2.2.1.2 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE PROTEINA SOLUBLE.

El contenido de proteína soluble del suero de leche se determinó por el método de Lowry (1951) detallado previamente en el informe de avance No 1.

2.2.1.3 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD.

Para determinar el contenido de humedad del suero de leche en polvo, se colocaron 2 gramos de la muestra en cápsulas de aluminio previamente pesadas. Seguidamente las cápsulas se calentaron hasta 100 °C durante un período de 24 horas. Al final del período, y una vez alcanzada la temperatura ambiente, se pesaron nuevamente las cápsulas, y por diferencia se calculó el contenido de humedad (A.D.A.C).

2.2.1.4 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CENIZAS

Para determinar el contenido de cenizas del suero de leche en polvo, se colocan de 2 a 3 gramos de la muestra en crisoles de porcelana previamente pesados. Seguidamente se somete la muestra a incineración, en una mufla a una temperatura de 550 °C, durante un período de 4 horas. Finalmente, se pesan los crisoles y por diferencia se obtiene el contenido de cenizas.

2.2.1.5 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE Na, K, Y Ca.

La determinación del contenido de Na, K y Ca presente en el suero de leche, se realizó utilizando la técnica de absorción atómica. Las muestras de suero hidrolizado (ver sección 2.3) fueron apropiadamente diluidas en agua destilada y posteriormente, se emplearon en la determinación de los elementos indicados.

2.2.2 ANALISIS EFECTUADOS AL LICOR DE REMOJADO DE MAIZ.

Al Licor de remojado de maíz se le determinó el contenido de nitrógeno, fósforo, azúcares totales, azúcares reductores, humedad y cenizas.

2.2.2.1 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE NITROGENO.

Se determinó el contenido de nitrógeno del Licor de remojado de maíz por el método de Kjeldahl. En esta metodología se prevee: 1) la digestión de la materia orgánica presente en la muestra con ácido sulfúrico concentrado, 2) la destilación del amoníaco liberado a partir del sulfato de amonio en solución alcalina y 3) titulación del ácido sulfúrico en exceso con una solución valorada de NaOH.

El procedimiento a seguir es el siguiente:

Digestión: se coloca 1 ml de la muestra en un balón de digestión. Se añaden entre 15 y 18 gramos de sulfato de potasio, 0,5 gramos de sulfato cúprico y 25 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se calienta la muestra durante un periodo de 4 horas.

Destilación: Se enfría el balón y se añaden cuidadosamente 200 ml de agua destilada. Se mezcla el contenido y se coloca en el balón una tira de papel tornasol alcalino. Con el balón inclinado, se agregan de 50 a 75 ml de solución de hidróxido de sodio al 50%. Se conecta el balón al condensador y se destilan entre 150 y 200 ml manteniendo sumergido el extremo de salida del condensador en 50 ml de una solución de H_2SO_4 0,1 N a la cual se le añaden unas gotas de rojo de metilo como indicador.

Titulación : el exceso de ácido sulfúrico se titula con una solución valorada de NaOH 0,1 N.

2.2.2.2 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE FOSFORO.

En la determinación del contenido de fósforo del licor de remojo de maíz, se utilizó el método colorimétrico descrito en la A.O.A.C. (1975), el cual se fundamenta en la formación de un complejo coloreado entre el fósforo presente en

la muestra y el vanodomolibdato. Previo al análisis debe prepararse una solución de cenizas de la muestra, incinerando el material según lo establecido en la sección (2.2.1.4).

Obtenidas las cenizas, éstas se humedecen con 5 ml de HCl 1:1 y se calientan hasta sequedad. Posteriormente se adicionan 5 ml de HCl 1:1 y se calienta por un periodo de 30 minutos. Finalizado este tiempo se filtra la solución a través de papel de filtro sin cenizas y se recoge el filtrado en un matraz aforado de 250 ml. Posteriormente el papel con las cenizas insolubles se incinera (2.2.1.4). A las cenizas obtenidas se le añaden 5 ml de HCl 1:1 y se calienta por un periodo de 5 minutos en baño de maría. Al cabo de este tiempo se filtra el contenido y se adiciona al mismo matraz aforado de 250 ml y se lleva a volumen.

Se transfiere un mililitro de la solución obtenida a un matraz aforado de 100 ml y se añaden 2,5 ml de solución vanodomolibdica y se completa con agua destilada c.s.p. 100 ml. Finalmente, se determina la densidad óptica a 420 nm habiendo preparado con anterioridad una curva de calibración para diferentes concentraciones de fósforo comprendidas entre 20-100 µg por 100 ml.

Solución Vanodomolibdica: Se disuelven 1,2 gramos de Monovanadato de amonio en 300 ml de agua destilada a una

temperatura de 80-90 °C. Gradualmente se añaden 170 ml de ácido nítrico. se agregan 8.55 gramos de molibdato de amonio tetrahidratado y se completa hasta 500 ml.

2.2.2.3 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE AZUCARES TOTALES.

Los azúcares totales presentes en el licor de remojo de maíz se determinaron colorimétricamente empleando el método de Antrona descrito por Scott y Melvin (1953), según el cual se genera un compuesto coloreado, producto de la condensación de la antrona con el furfural formado a partir de los azúcares presentes en medio ácido, el cual absorbe a 625 nm.

A un tubo de ensayo sumergido en baño de hielo, con 5 ml del reactivo de Antrona, se le adicionan 1 ml del cultivo apropiadamente diluido. Seguidamente, se mezcla rápidamente en vortex y se calienta a 100 °C durante 10 minutos. Al cabo de este tiempo, se sumerge el tubo rápidamente en baño de hielo. Posteriormente se lee la absorbancia a 625 nm. Para finalizar, se construye una curva de calibración empleando soluciones de glucosa en un rango de concentración comprendido entre 20-80 µg por ml (Scott, 1953)

Reactivo de Antrona: Se disuelven 200 mg de antrona en 5 ml de etanol absoluto en un erlenmeyer de 100 ml. Posteriormente, se agrega ácido sulfúrico al 75% hasta obtener un volumen final de 100 ml.

2.2.2.4 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE AZUCARES REDUCTORES.

El contenido de azúcares reductores del licor de remojado de maíz se determinó empleando el método del ácido dinitrosalicílico descrito en la sección (2.2.1.1).

2.2.2.5 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD.

En la determinación de humedad del licor de remojado de maíz se utilizó el procedimiento descrito en la sección (2.2.1.3).

2.2.2.6 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CENIZAS.

Se determinó de igual forma que en la sección (2.2.1.4).

2.3 HIDROLISIS Y SEPARACION DE PROTEINAS DEL SUERO DE LECHE.

Con la finalidad de remover las proteínas del suero de leche, se empleó una hidrólisis ácida según la metodología descrita por Bahar, S. (comunicación personal). Para ello, dependiendo de la concentración de lactosa requerida en el hidrolizado, se disuelve un peso de suero en polvo, en agua destilada y se ajusta el pH de la solución obtenida a un valor de 4 con H_2SO_4 2N. Seguidamente, se somete la preparación a 121 °C por un periodo de 15 minutos. Posteriormente, finalizado el tratamiento térmico, se filtra la solución de suero hidrolizado a través de papel Whatman No 1 y se almacena bajo refrigeración.

2.4 EXPERIMENTOS REALIZADOS

2.4.1 CRECIMIENTO A NIVEL DE FERMENTADOR DE 7 LITROS EMPLEANDO COMO FUENTE DE LACTOSA SUERO DE LECHE EN POLVO AL 5% (P/V).

Medio de cultivo empleado y condiciones de proceso:

Suero de leche en polvo.....	5,00%
Extracto de Levadura.....	0,75%
Sulfato de Amonio.....	0,84%
Sulfato de Magnesio.....	0,05%
Fosfato de potasio dibásico.....	0,45%

En el experimento se utilizó un fermentador de 7 litros de capacidad (marca New Brunswick Scientific, modelo Ma-107), empleando una agitación de 198 rpm, una aireación de 0,2 vvm, una temperatura de 30 °C, un pH inicial de 5,5 y un volumen de inóculo correspondiente al 10% del volumen final de fermentación. Se tomaron muestras a intervalos de 1 hora durante un periodo total de fermentación de 6 horas y se determinó la actividad de la B-galactosidasa, el contenido de lactosa residual y el crecimiento microbiano, de conformidad al procedimiento descrito en el primer informe de avance de 1989.

2.4.2 OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE B-GALACTOSIDASA.

Con la finalidad de disminuir los costos de operación en la producción de la enzima se estudió la posible sustitución de la lactosa y el extracto de levadura presentes en el medio de referencia por suero de leche hidrolizado y licor de remojado de maíz respectivamente. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado a nivel de frascos agitados de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo a una temperatura de 30 °C, una agitación de 200 rpm, un pH inicial de 5.5 y un volumen de inóculo equivalente al 10% del volumen total. En las tablas No. 2 y 3 se indican la composición de los diferentes medios empleados.

2.4.2.1 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUSTITUCION DE LACTOSA POR SUERO DE LECHE HIDROLIZADO.

Para determinar el efecto de la sustitución de lactosa por suero de leche hidrolizado sobre la producción de la β -galactosidasa se cultivó el microorganismo en los medios 1, 2, y 3 (Tablas No. 2 y No. 3) y se determinó la actividad de la enzima así como la biomasa obtenida al cabo de 3 y 6 horas de fermentación.

2.4.2.2 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUSTITUCION DEL EXTRACTO DE LEVADURA Y DEL SULFATO DE AMONIO POR LICOR DE REMOJADO DE MAIZ.

Para determinar el efecto de la sustitución del extracto de levadura y el sulfato de amonio por licor de remojado de maíz sobre la producción de la enzima se cultivó el microorganismo en los medios 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Igualmente, se determinó la actividad de la enzima así como la biomasa obtenida al cabo de 3 y 6 horas de fermentación.

2.4.3 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS DE Kluyveromyces fragilis EMPLEANDO LACTOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

Las constantes cinéticas K_s y μ_{max} de Kluyveromyces fragilis se evaluaron en el medio de referencia y en el medio No.

10 (Tabla No. 3) que contiene en su formulación suero hidrolizado de leche y licor de remojo de maíz. A continuación se describe la metodología desarrollada para la obtención de las constantes cinéticas de la levadura en ambos medios.

2.4.3.1 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS EN EL MEDIO DE REFERENCIA.

Para determinar las constantes cinéticas K_s y μ_{max} de la levadura, se evaluaron las cinéticas de crecimiento en el medio indicado (medio de referencia-México), usando para ello diferentes concentraciones de lactosa y manteniendo constantes la concentración del resto de los componentes del medio de cultivo.

El inóculo inicial se obtuvo mediante el cultivo de 2 asadas de la levadura en 100 ml de medio de referencia (México) conteniendo lactosa al 2% (p/v). Posteriormente, el cultivo primario así obtenido, se incubó a 29 °C durante 18 h y 200 rpm en el mismo medio de cultivo de referencia.

Para la obtención de las curvas de crecimiento, se adicionaron 10 ml de cultivo primario a un volumen de medio de referencia de tal manera de obtener luego de la adición del inóculo 100 ml de cultivo con las siguientes concentraciones de lactosa: 0,075, 0,15, 0,35, 0,45, 0,7 % (p/v). Posteriormente, los frascos se incubaron bajo agitación orbital a 200 rpm y a una

temperatura de 30 °C.

A lo largo de la fermentación y a diferentes intervalos de tiempo se extrajeron 2 ml del cultivo microbiano de cada uno de los frascos correspondientes a cada concentración de lactosa (en condiciones de esterilidad). Seguidamente, cada muestra se diluyó 1/50 con agua destilada y se determinó la densidad óptica de la suspensión microbiana a 650 nm. (según el procedimiento descrito en el primer informe de avance, 1989).

La velocidad específica de crecimiento correspondiente a cada concentración de lactosa, se calculó considerando el tiempo comprendido entre las 2 y 3,5 horas de fermentación dada la existencia de la fase de crecimiento exponencial en todas las cinéticas consideradas de conformidad con la siguiente expresión matemática.

$$\mu = \frac{\text{Ln (Biomasa final)} - \text{Ln (Biomasa inicial)}}{\text{Tiempo final} - \text{Tiempo inicial}}$$

Las constantes cinéticas K_S y μ_{\max} fueron calculadas graficando los inversos de la velocidad específica de crecimiento contra los inversos de la concentración de sustrato.

2.4.2.2 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS EN EL MEDIO FORMULADO No 10.

Con la finalidad de obtener diferentes concentraciones de lactosa se realizaron diluciones apropiadas del suero de leche hidrolizado. (según descrito en la sección 2.3). Posteriormente a cada una de las concentraciones de lactosa utilizadas (0.5, 1, 2, 3, 4, y 5%) se le añadieron los componentes indicados para el medio No 10. (ver tabla No 3) .

El inóculo empleado se obtuvo mediante la adición de dos asadas de la levadura en 100 ml de medio No 10. Posteriormente, se incubó por un periodo de 18 horas a una temperatura de 29 °C y una agitación orbital de 200 rpm.

El volumen de inoculación empleado, así como la determinación de la biomasa obtenida para cada concentración de lactosa, durante la fermentación, se realizó de igual forma que en la sección 2.4.3.1.

La velocidad específica de crecimiento correspondiente a cada concentración de lactosa se calculó considerando el intervalo de tiempo comprendido entre 2 y 4 horas de fermentación dada la existencia, durante este periodo, de una fase de crecimiento exponencial.

3.RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 COMPOSICION DE LA MATERIA PRIMA

Los resultados obtenidos en el análisis de la composición del suero de leche y el licor de remojado de maíz se especifican en la tabla No 1.

Los valores numéricos obtenidos en el desarrollo de cada experimento se encuentran indicados en el apéndice A.

3.2 CRECIMIENTO DE K.fragilis EN FERMENTADOR DE 7 LITROS

EMPLEANDO COMO FUENTE DE LACTOSA SUERO DE LECHE EN POLVO AL 5%

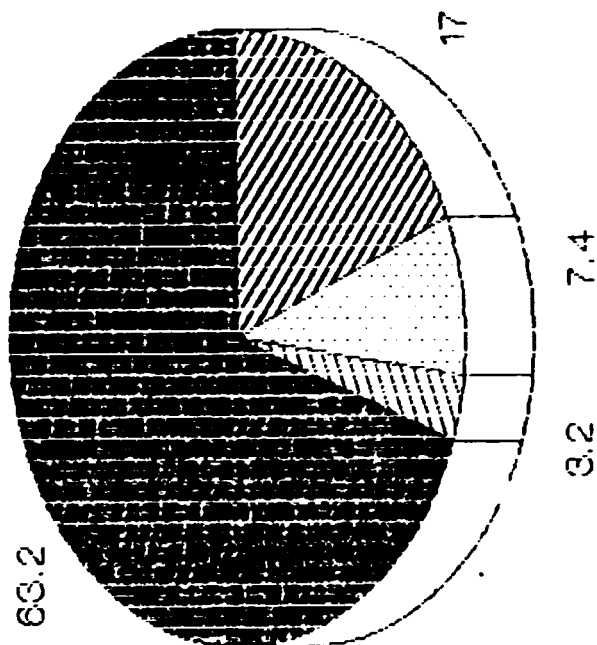
Como puede observarse en las figuras No 1 y No 2, al emplear 5% (p/v) de suero de leche como sustituto de la lactosa se obtiene un menor crecimiento de la levadura, alcanzándose un máximo de 3,745 mg/ml en comparación al mayor valor de biomasa obtenido al emplear lactosa comercial (5,931 mg/ml).

El menor crecimiento de la levadura al emplear 5% de suero de leche en polvo probablemente se deba a la menor concentración de lactosa (3,18%) que se obtiene al adicionar al medio de cultivo 5% de suero de leche en polvo (Ver tabla No. 1, Figs. 1a y 1b).

TABLA No 1 COMPOSICION DE LA MATERIA PRIMA

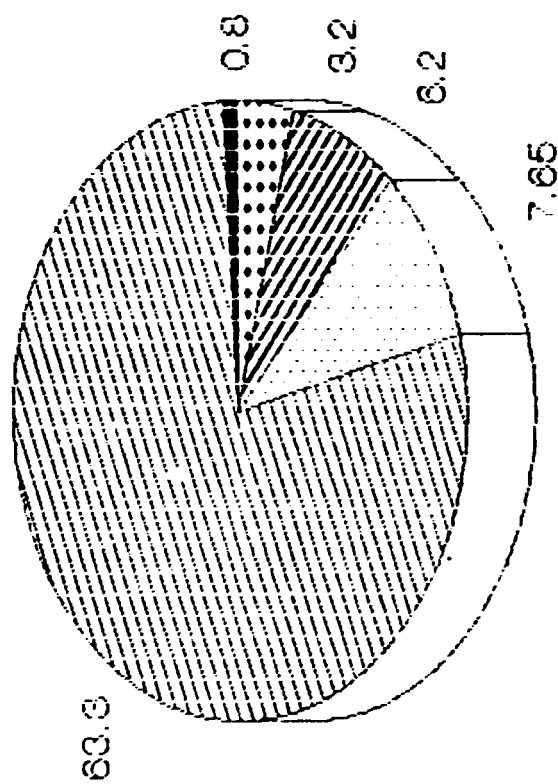
SUERO DE LECHE EN POLVO	
HUMEDAD	3,2% (P/P)
CONTENIDO DE LACTOSA	63,6% (P/P)
PROTEINA SOLUBLE	138,47 mg/ml
CENIZAS	7,4% (P/P)
SOLUCION DE SUERO DE LECHE HIDROLIZADO UTILIZADA EN LOS EXPERIMENTOS	
CONTENIDO DE LACTOSA	5% (P/V)
PROTEINA SOLUBLE	2,48 mg/ml
CONTENIDO DE K	1480 +/- 10 ppm
CONTENIDO DE Na	654 +/- 6 ppm
CONTENIDO DE Ca	200 + 4 ppm
LICOR DE REMOJADO DE MAIZ	
CONTENIDO DE NITROGENO	3,2% (P/V)
CONTENIDO DE FOSFORO	0,8% (P/V)
CONTENIDO DE AZUCARES TOTALES	3,4 g/ml
CONTENIDO DE AZUCARES REDUCTORES	6,2% (P/V)
CONTENIDO DE HUMEDAD	63,3% (P/V)
CONTENIDO DE CENIZAS	1,7% (P/V)

COMPOSICION PORCENTUAL DEL SUERO DE LECHE EN POLVO



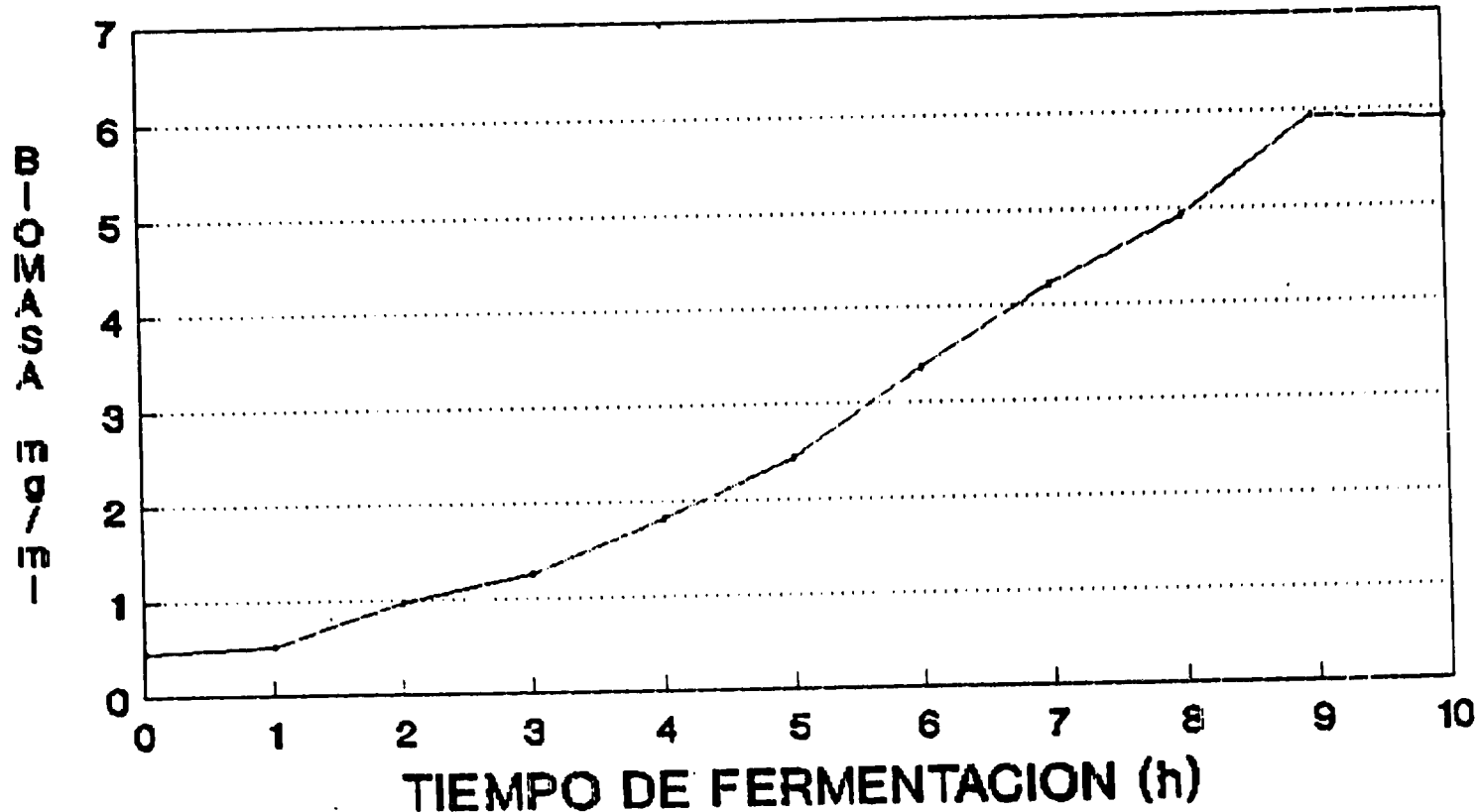
**63,6% lactosa; 17% proteina;
7,4% cenizas; 3,2 humedad.**

COMPOSICION PORCENTUAL DEL LICOR DE REMOJADO DE MAIZ



Humedad 63,3%; cenizas 7,65% ;
azúcares reductores 6,2% ;
nitrógeno 3,2% ; fósforo 0,8%

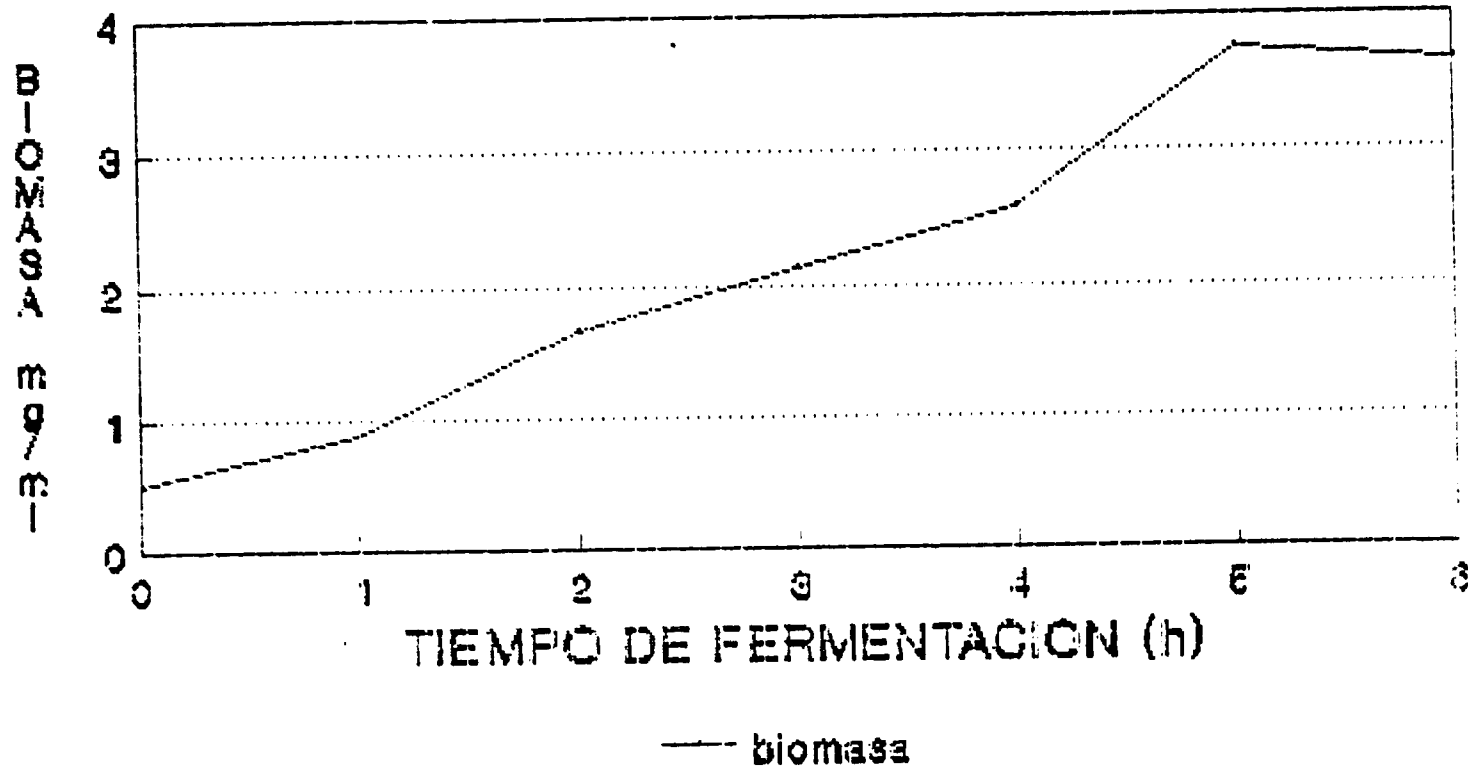
CRECIMIENTO DE *K. fragilis* EN FERMENTADOR DE 7 LITROS



EMPLEANDO MEDIO DE REFERENCIA
CON 5% DE LACTOSA COMERCIAL

FIGURA No. 1C

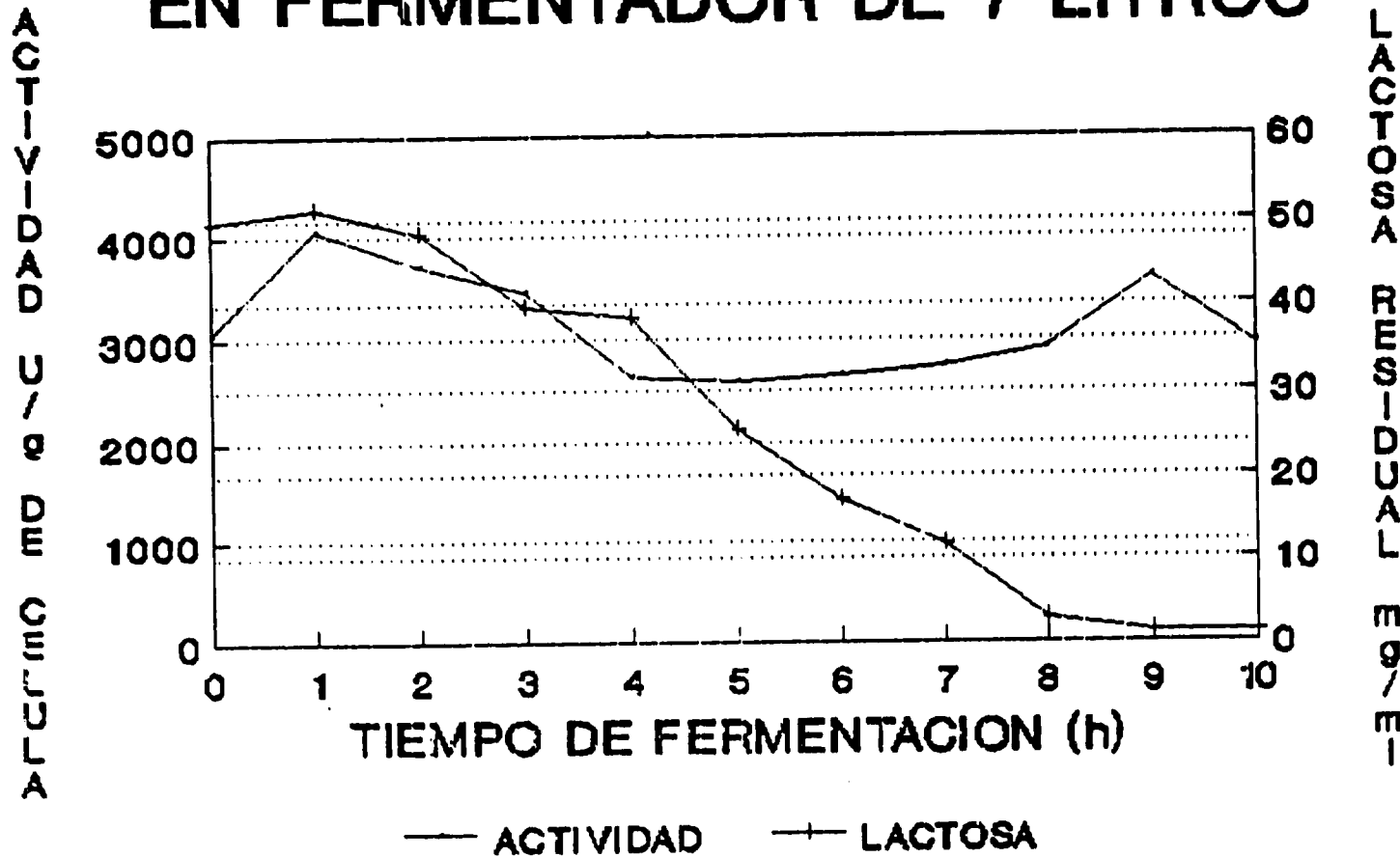
CRECIMIENTO DE *K. fragilis* EN FERMENTADOR DE 7 LITROS



EMPLEANDO 6% DE SUERO DE LECHE EN POLVO
COMO SUSTITUTO DE LA LACTOSA

FIGURA No. 2

CRECIMIENTO DE *K. fragilis* EN FERMENTADOR DE 7 LITROS



EMPLEANDO MEDIO DE REFERENCIA
CON 5% DE LACTOSA COMERCIAL

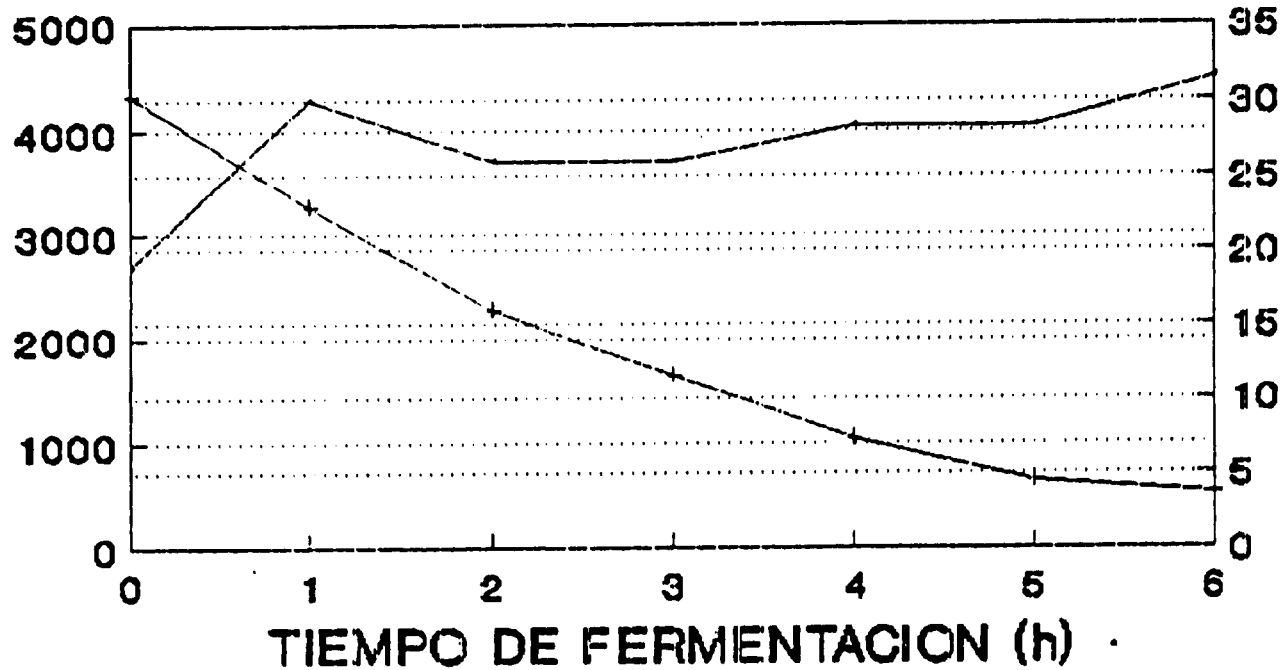
FIGURA No. 3

21
21

CRECIMIENTO DE *K. fragilis* EN FERMENTADOR DE 7 LITROS

ACTIVIDAD U₉ DE OELGUA

LACTOSA RESIDUAL M₉/M₁



— ACTIVIDAD ENZIMATICA + LACTOSA

EMPLEANDO SUERO DE LECHE HIDROLIZADO
COMO 5% DE LACTOSA.

FIGURA No. 4

Al existir una menor concentración de la fuente de carbono, el contenido de energía es limitado y esto se traduce en un menor crecimiento del microorganismo durante la fermentación.

Por otra parte, tampoco se observó (Figuras No. 1c, 2, 3, y 4) una disminución en los niveles de actividad enzimática/célula al emplear suero de leche en polvo en el medio de cultivo.

3.3 OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE B-GALACTOSIDASA.

3.3.1 EFECTO DE LA SUSTITUCION DE LACTOSA POR SUERO DE LECHE HIDROLIZADO

Con la finalidad de estudiar la posible sustitución de la lactosa presente en el medio de referencia por un compuesto más económico, y tomando en consideración los resultados obtenidos en la sección precedente, se empleó el suero hidrolizado de leche en la formulación de los medios (ver tabla No 2 donde se especifica la formulación de los medios de cultivo en estudio).

TABLA 2 COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO	1	2	3	4
SUERO DE LECHE HIDROLIZADO 5% DE LACTOSA	-	*	*	*
LICOR DE REMOJADO DE MAIZ	-	-	-	-
LACTOSA COMERCIAL 5%	*	-	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,84%	0,84%	-	0,84%
K_2HPO_4	0,45%	0,45%	-	0,45%
EXTRACTO DE LEVADURA	0,75%	0,75%	-	-
MgSO_4	0,05%	0,05%	-	0,05%

TABLA No 3 COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO
(CONTINUACION)

MEDIO	5	6	7	8	9	10
SUERO DE LECHE HIDROLIZADO 5% DE LACTOSA	*	*	*	*	*	*
LICOR DE REMOJADO DE MAIZ	0%	0,5%	1%	2,5%	5%	1%
LACTOSA COMERCIAL 5%	-	-	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	0,42%
K ₂ HPO ₄	0,45%	0,45%	0,45%	0,45%	0,45%	0,45%
EXTRACTO DE LEVADURA	-	-	-	-	-	-
MgSO ₄	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%

A manera de control, se realizó el crecimiento de *K. fragilis* en suero de leche hidrolizado con una concentración de lactosa al 5% (F/V) como único constituyente del medio de cultivo (medio No 3).

Al emplear el medio de cultivo No 3 los valores de actividad enzimática por gramo de célula y por litro de cultivo a las 6 horas de fermentación son inferiores (3465 U/g y 10.906 U/l) a los obtenidos cuando se suplementa el suero de leche hidrolizado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , extracto de levadura y MgSO_4 (3755 U/g y 14.222 U/l) correspondiente a la composición del medio No 2.

El suero de leche hidrolizado por sí sólo no es suficiente para un buen crecimiento de la levadura y producción de la enzima. Por el contrario los resultados obtenidos indican la necesidad de la incorporación de fuentes adicionales de nitrógeno y fósforo al medio de cultivo para obtener un incremento en los valores de actividad enzimática comparables a los que se obtienen al emplear el medio de referencia.

Dado que el suero de leche hidrolizado como único constituyente del medio de cultivo no es suficiente para obtener resultados satisfactorios, se formuló el medio de cultivo No 2 que contiene suero hidrolizado de leche como fuente de lactosa y

ACTIVIDAD LACTASICA POR GRAMO DE CELULA

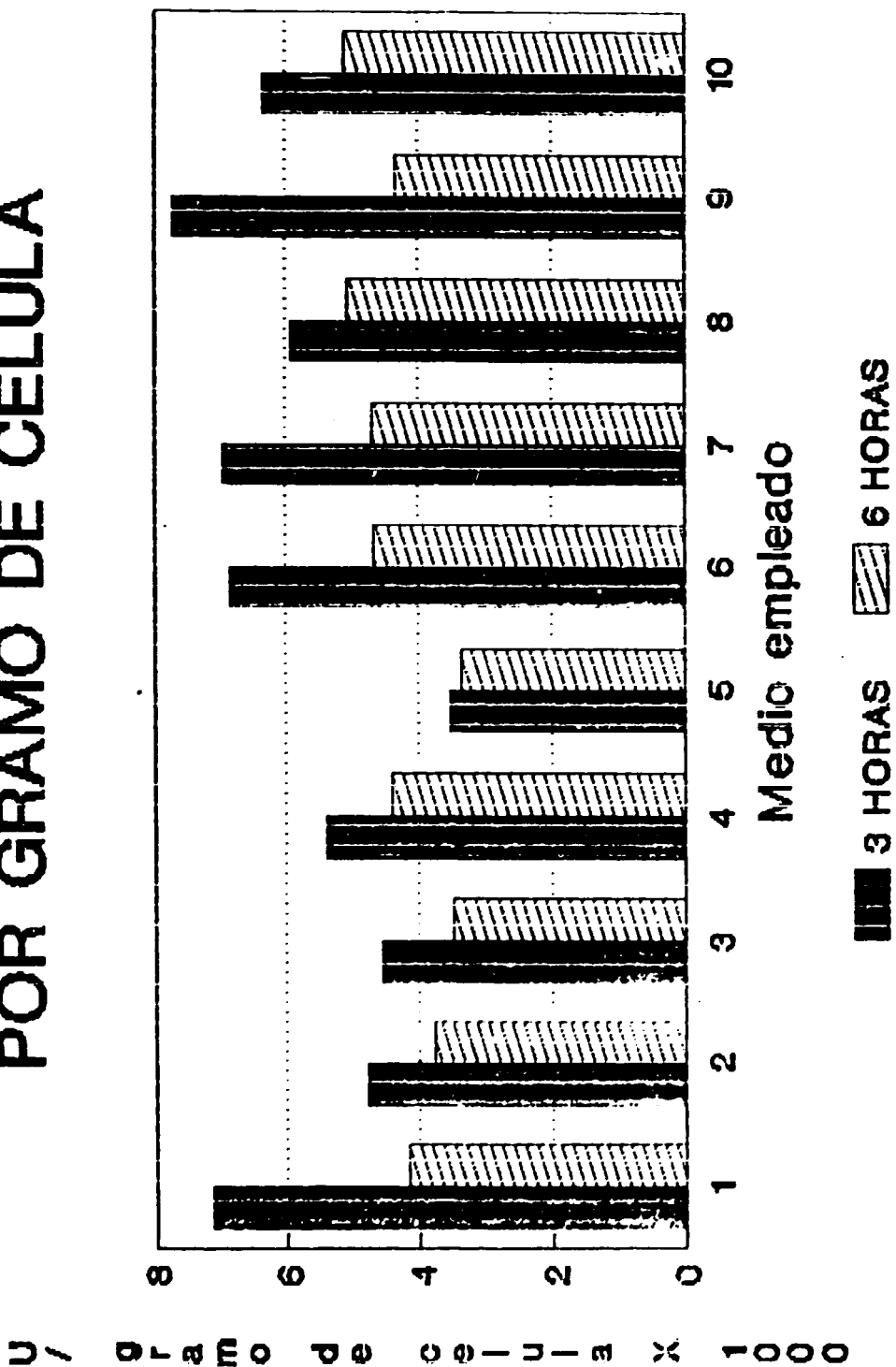


FIGURA No. 5

el resto de los constituyentes presentes en el medio de referencia. (Ver tabla No 2).

Al comparar el medio formulado No. 2 con el medio de referencia (medio No.1 figura No 5) se observa un valor inferior de actividad enzimática por gramo de célula a las tres horas de fermentación (4759 U/g) en comparación a la actividad obtenida al utilizar el medio No. 1 durante el mismo período (7110 U/g). Sin embargo, a las 6 horas de fermentación la actividad enzimática por gramo de célula es similar al emplear ambos medios (4160 U/g y 3755 U/g respectivamente).

Por otra parte, al emplear el medio No. 2 la actividad enzimática por litro de cultivo (figura No 7) es similar a la obtenida cuando se utiliza lactosa comercial a las tres horas de fermentación (5808 U/l y 5701 U/l respectivamente). En cambio, a las 6 horas de fermentación al emplear suero de leche hidrolizado se obtiene una actividad por litro de cultivo superior de 14.222 U/l en comparación al uso de lactosa comercial para la cual se obtiene 12.604 U/l de cultivo.

Estos resultados indican que la sustitución de lactosa por suero hidrolizado de leche es apropiada, debido a que se obtiene un mayor crecimiento del microorganismo durante la fermentación (Ver figura 6) lo que genera un incremento en la actividad enzimática por litro de cultivo.

BIOMASA

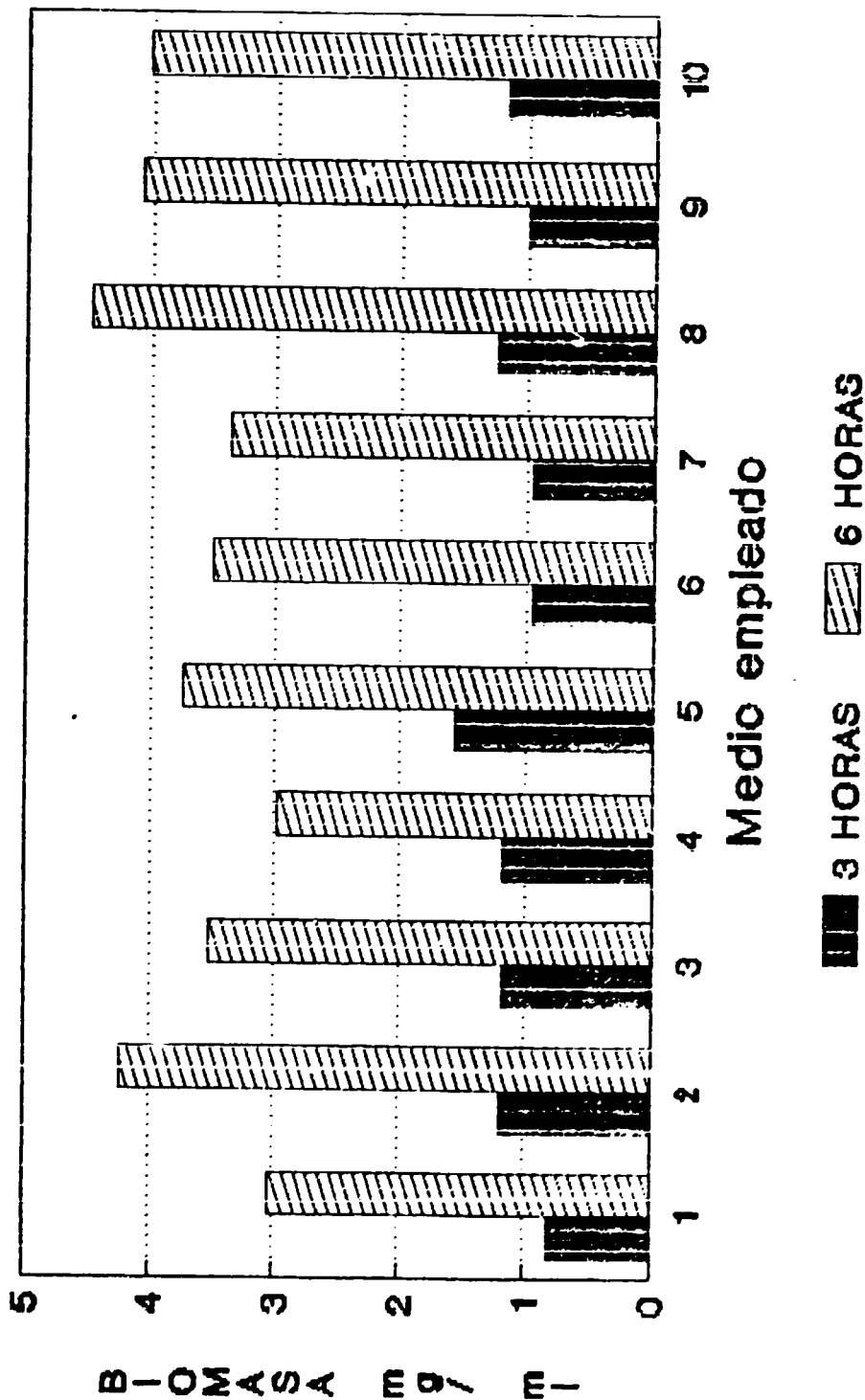


FIGURA No. 6

ACTIVIDAD LACTASICA POR LITRO DE CULTIVO

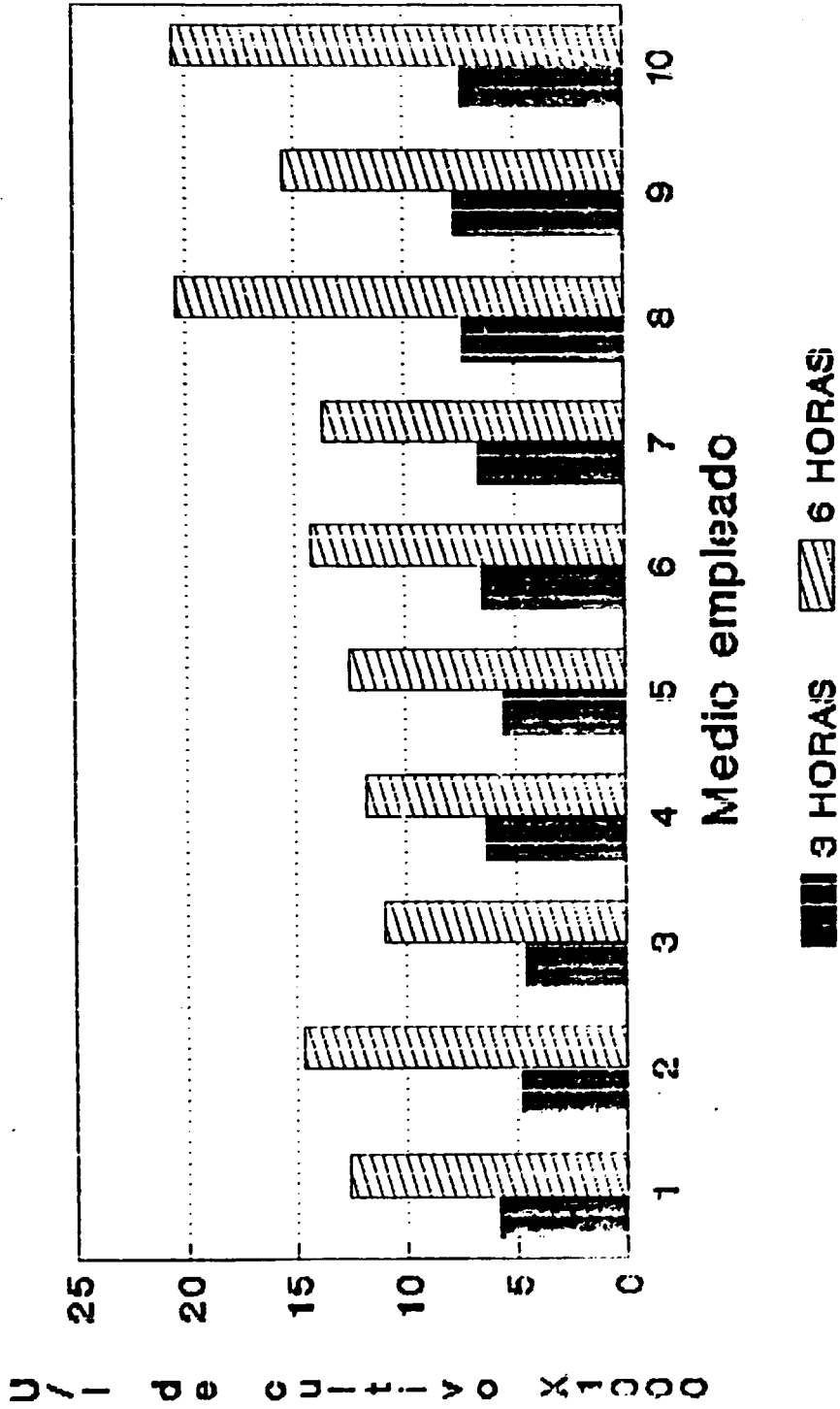


FIGURA No. 7

El uso del suero de leche hidrolizado permite no sólo disminuir los costos de operación durante el proceso si no también el aprovechamiento de un producto, el cual en gran parte es en la actualidad descargado a corrientes agua, ocasionando problemas de contaminación ambiental.

3.3.2 EFECTO DE LA SUSTITUCION DEL EXTRACTO DE LEVADURA Y EL SULFATO DE AMONIO POR LICOR DE REMOJADO DE MAIZ.

En base a los resultados obtenidos la sección (3.3.1) resulta favorable en términos de actividad enzimática por litro de cultivo, la sustitución de la lactosa comercial por suero de leche hidrolizado debido a que se favorece un mayor crecimiento de la levadura. Sin embargo, aunque la biomasa obtenida durante la fermentación es mayor, no se observa un incremento en la actividad por gramo de célula al utilizar este producto. Probablemente sea necesario la incorporación de nuevas fuentes de nitrógeno y fósforo en el medio de cultivo que estimulen además del crecimiento microbiano la producción enzimática por célula. Por esta razón, se estudió el efecto de la sustitución del extracto de levadura y el sulfato de amonio por licor de remojado de maíz.

Como se observa en la figuras No. 5 y 7, al sustituir el extracto de levadura por el licor de remojado de maíz (medios de cultivo 6,7,8,9 y 10) existe un incremento en la actividad enzimática por célula y por litro de cultivo en comparación a la actividad obtenida en el medio No 2.

Igualmente, los valores de actividad enzimática por gramo de célula al emplear los medios 6,7,8,9 y 10 son similares y en algunos casos superiores a los obtenidos cuando se emplea el medio de referencia (medio No 1) independientemente de la concentración de licor de remojado de maíz utilizada.

Cabe destacar, que si bien se obtuvo en promedio un aumento en la actividad enzimática por gramo de célula al emplear 1% (v/v) de licor de remojado de maíz (figura No 5) con respecto al medio de cultivo libre de este producto, no se observó un incremento significativo en la actividad enzimática al aumentar la concentración de la fuente de nitrógeno en un rango de 1 a 5% (v/v).

Dado que se obtienen valores similares de actividad enzimática por litro de cultivo al emplear 1 y 5% (v/v) de licor de remojado de maíz, se seleccionó la concentración menor de 1% como la apropiada en la formulación del medio de cultivo.

Por otra parte, al reducir la concentración de sulfato de amonio en el medio de cultivo de 0,84 a 0,42% (medio No 10) no se encontró una disminución pronunciada de la actividad enzimática por gramo de célula, observándose además la mayor actividad enzimática por litro de cultivo a las 6 horas de fermentación (20.501 U/l).

Los resultados indican que resulta favorable en la producción de la enzima, el empleo de el medio de cultivo No 10,

en el cual se sustituye el extracto de levadura por licor de remojado de maíz a una concentración del 1% (v/v) y se reduce la concentración de sulfato de amonio desde 0,84 a 0,42% (p/v).

Existen varias ventajas en el uso del medio No. 10 para la producción de la enzima:

-En primer lugar, al emplear licor de remojado de maíz en una concentración de 1% (v/v), se obtienen valores de actividad enzimática por célula similares a los obtenidos empleando el medio de referencia;

-Segundo, al utilizar el licor de remojado de maíz existe un incremento en los valores de actividad enzimática por litro de cultivo debido a un mayor crecimiento de la levadura, alcanzándose un valor máximo de 20.501 U/l y;

-Tercero, al emplear licor de remojado de maíz y reducir a la mitad la concentración de sulfato de amonio se logra una disminución en los costos de operación durante el proceso.

3.4 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS K_S Y μ_{max} DE K. fragilis.

3.4.1 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LA LEVADURA EN EL MEDIO DE REFERENCIA.

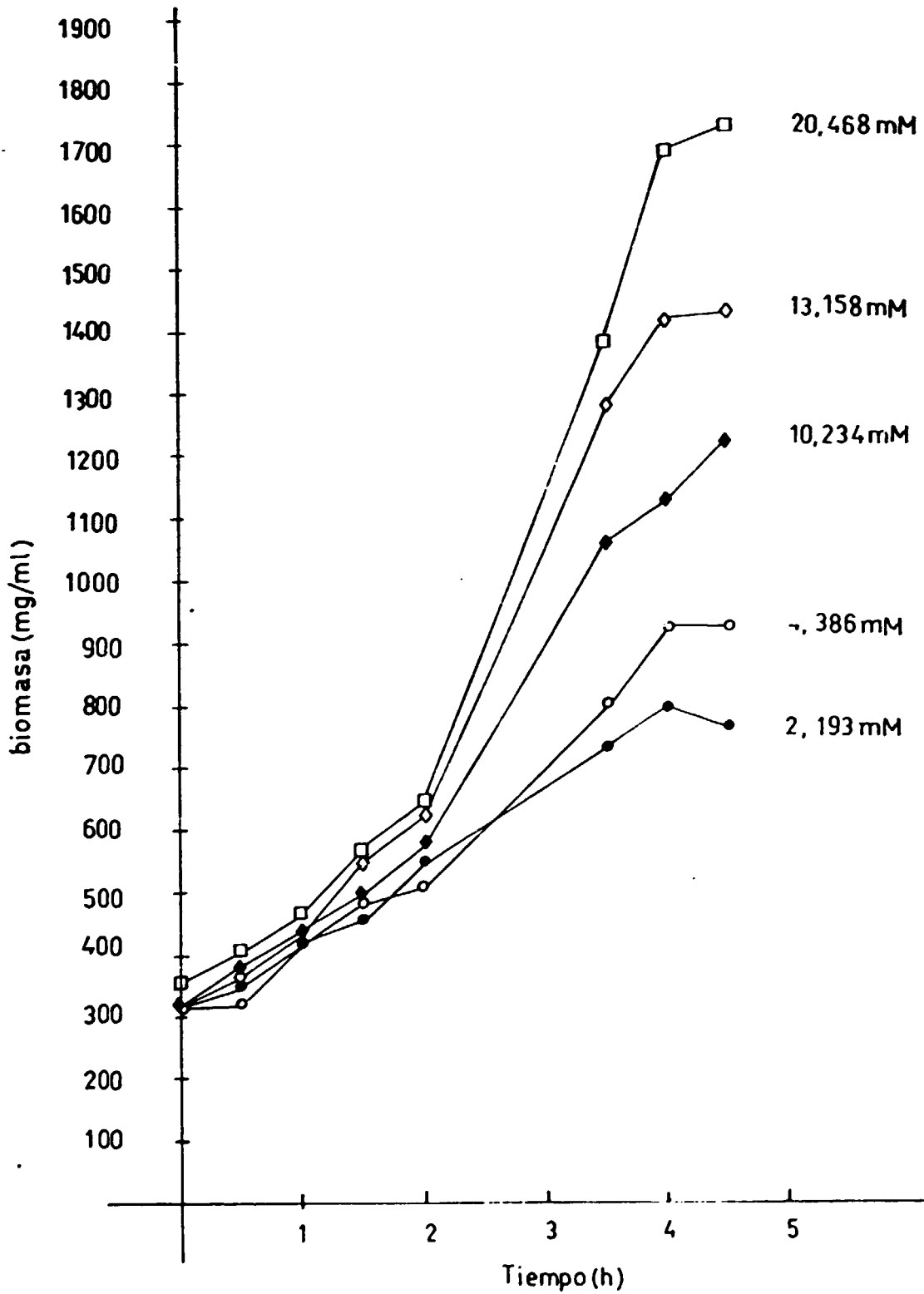
La figura No 8 muestra las cinéticas de crecimiento obtenidas para K. fragilis al emplear diferentes concentraciones de lactosa en el medio de referencia.

Experiencias previas demostraron que al utilizar concentraciones de lactosa superiores al 1% (p/v), se incrementa la duración de la fase exponencial de crecimiento alcanzándose una mayor biomasa final. Igualmente, se observa que bajo estas condiciones la velocidad específica de crecimiento es muy cercana a la velocidad máxima. Por esta razón, se seleccionaron para la determinación de las constantes cinéticas concentraciones de lactosa inferiores al 1% (P/V).

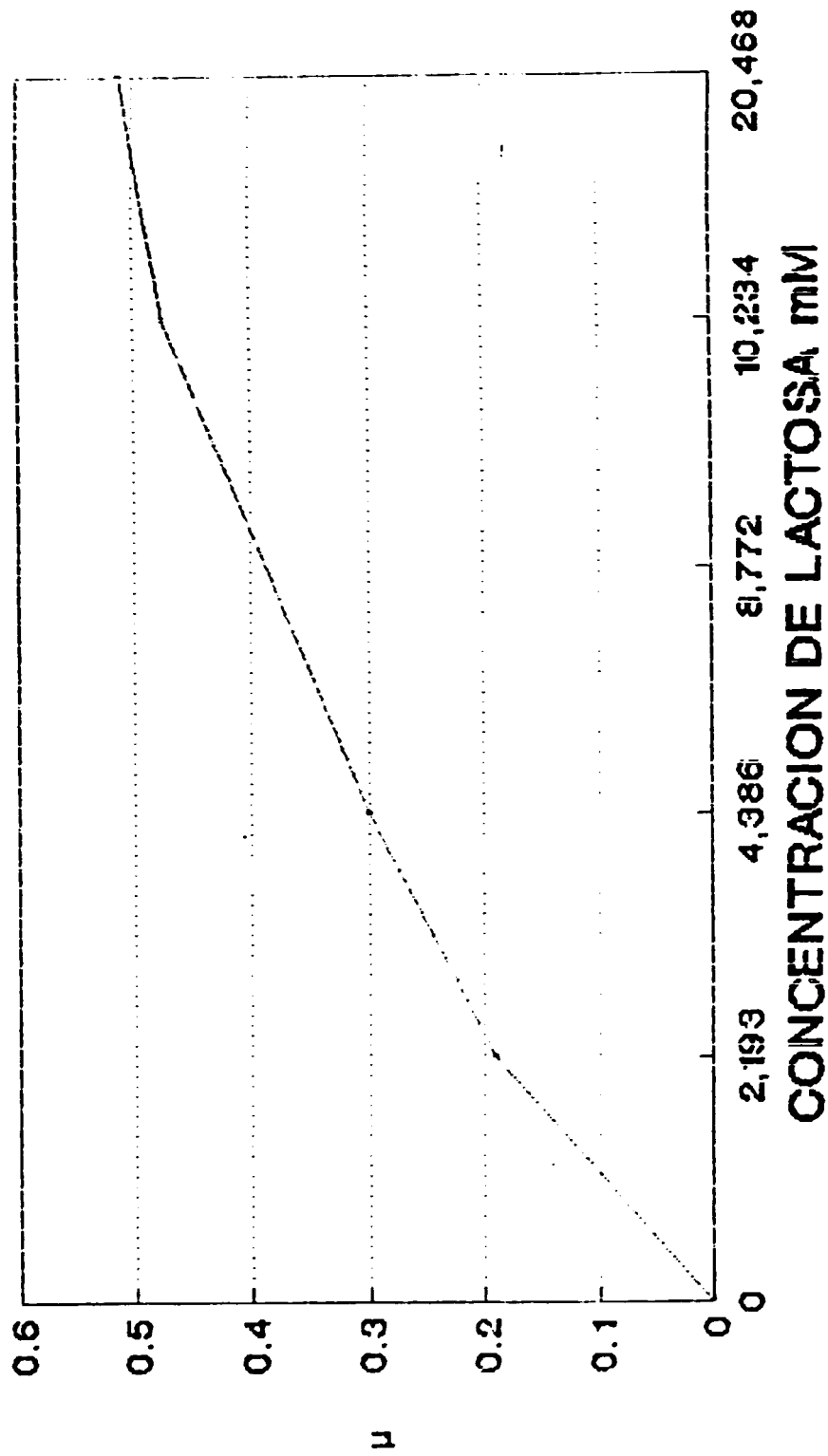
En el análisis de las curvas de crecimiento, se observa independientemente de la concentración de lactosa utilizada, la ausencia de un periodo de latencia. De manera similar, se puede apreciar que la biomasa final obtenida durante la fermentación incrementa al aumentar la concentración inicial de lactosa alcanzando un valor máximo de 1748 mg/l a una concentración de lactosa de 0,7%.

En la figura No 9 se puede observar que la

FIGURA No 8. Cinéticas de crecimiento para *Kluyveromyces fragilis* empleando diferentes concentraciones de lactosa comercial en el medio de referencia.



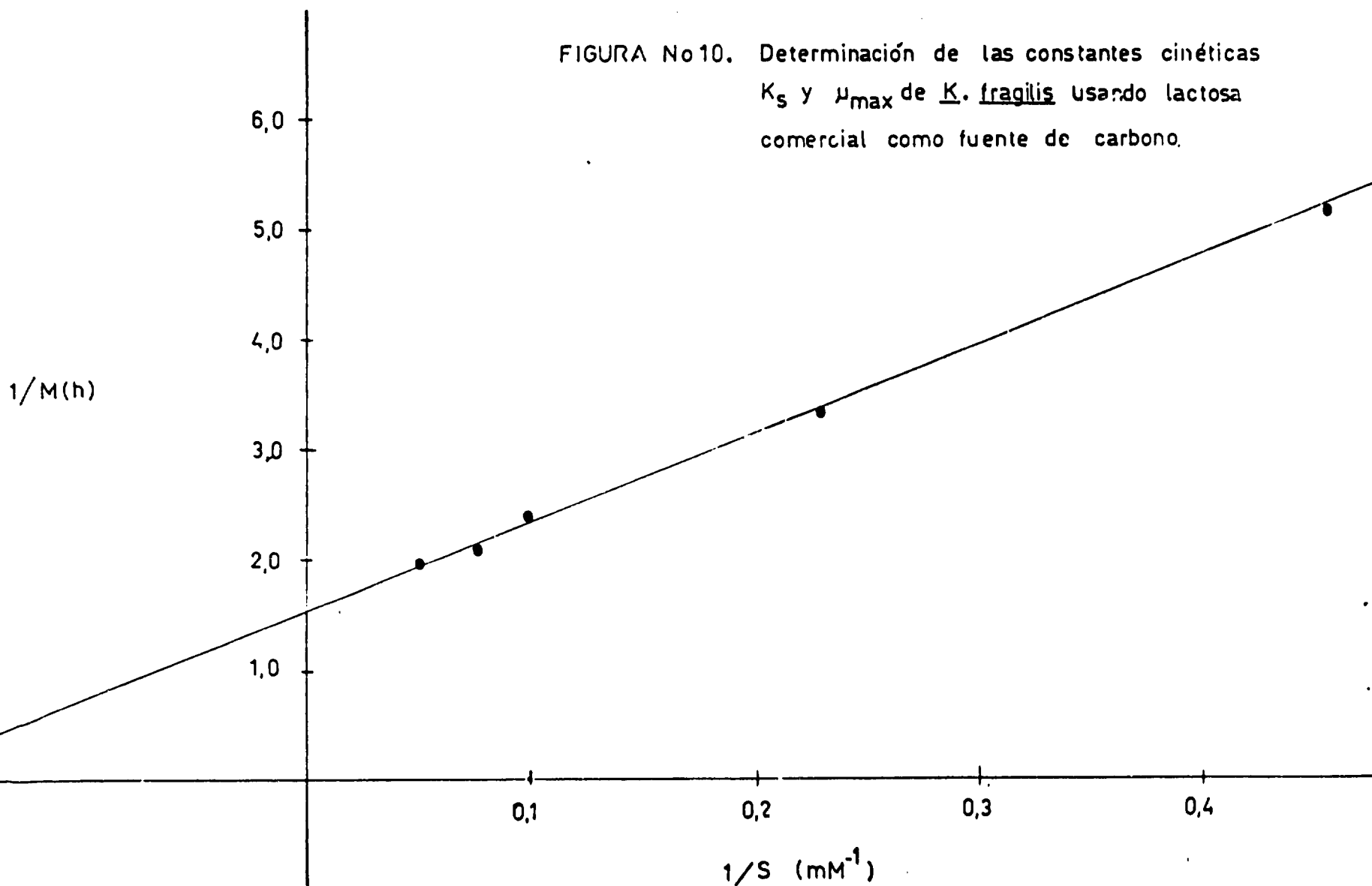
**EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE LACTOSA
SOBRE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE
CRECIMIENTO**



EMPLEANDO LACTOSA COMERCIAL.

FIGURA NO. 9

FIGURA No 10. Determinación de las constantes cinéticas K_s y μ_{max} de K. fragilis usando lactosa comercial como fuente de carbono.



37

velocidad específica de crecimiento (μ) aumenta al incrementar la concentración de lactosa en un rango de 0 a 20.46 mM.

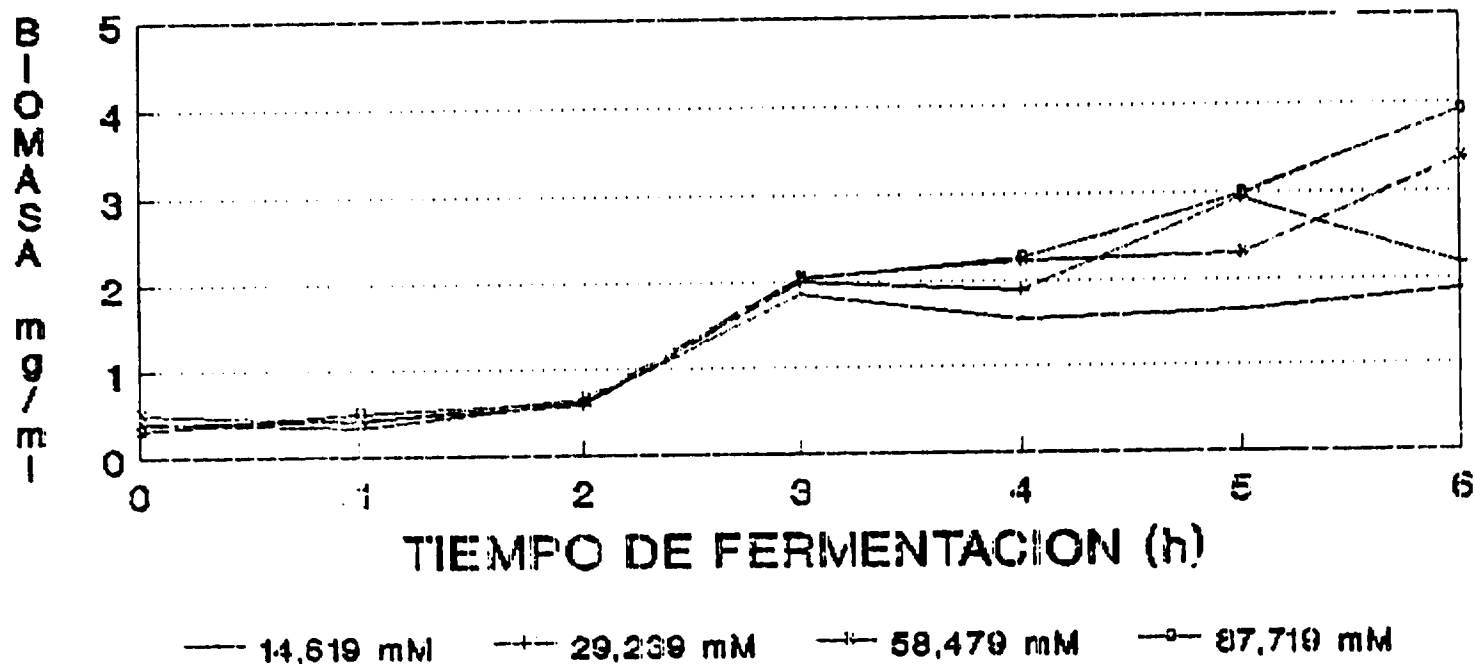
Al graficar los inversos de la velocidad específica de crecimiento contra el inverso de la concentración de sustrato (Figura No 10), se obtiene un valor de K_s de 5,34 mM y μ_{max} de 0,653 horas.⁻¹

3.4.2 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS DE LA LEVADURA EN EL MEDIO FORMULADO No 10.

La figura No 11, muestra las cinéticas de crecimiento de *K. fragilis* al emplear el medio No 10. Se evidencia la presencia de un período de latencia de aproximadamente 2 horas para todas las concentraciones de lactosa consideradas. Igualmente se observa que la biomasa final obtenida aumenta al incrementar la concentración inicial de lactosa, alcanzando un valor máximo de 3900 mg/l al utilizar una concentración de lactosa de 87,7 mM.

En la figura No 12, se puede observar que la velocidad específica de crecimiento (μ) aumenta al incrementar la concentración de lactosa (proveniente de suero hidrolizado) en un intervalo de 0 a 87,71 mM.

CINETICAS DE CRECIMIENTO PARA *K. fragilis* EMPLEANDO SUERO HIDROLIZADO DE LECHE



BIOMASA OBTENIDA PARA
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LACTOSA
EMPLEANDO SUERO DE LECHE HIDROLIZADO

FIGURA NO. 11

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE LACTOSA SOBRE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO

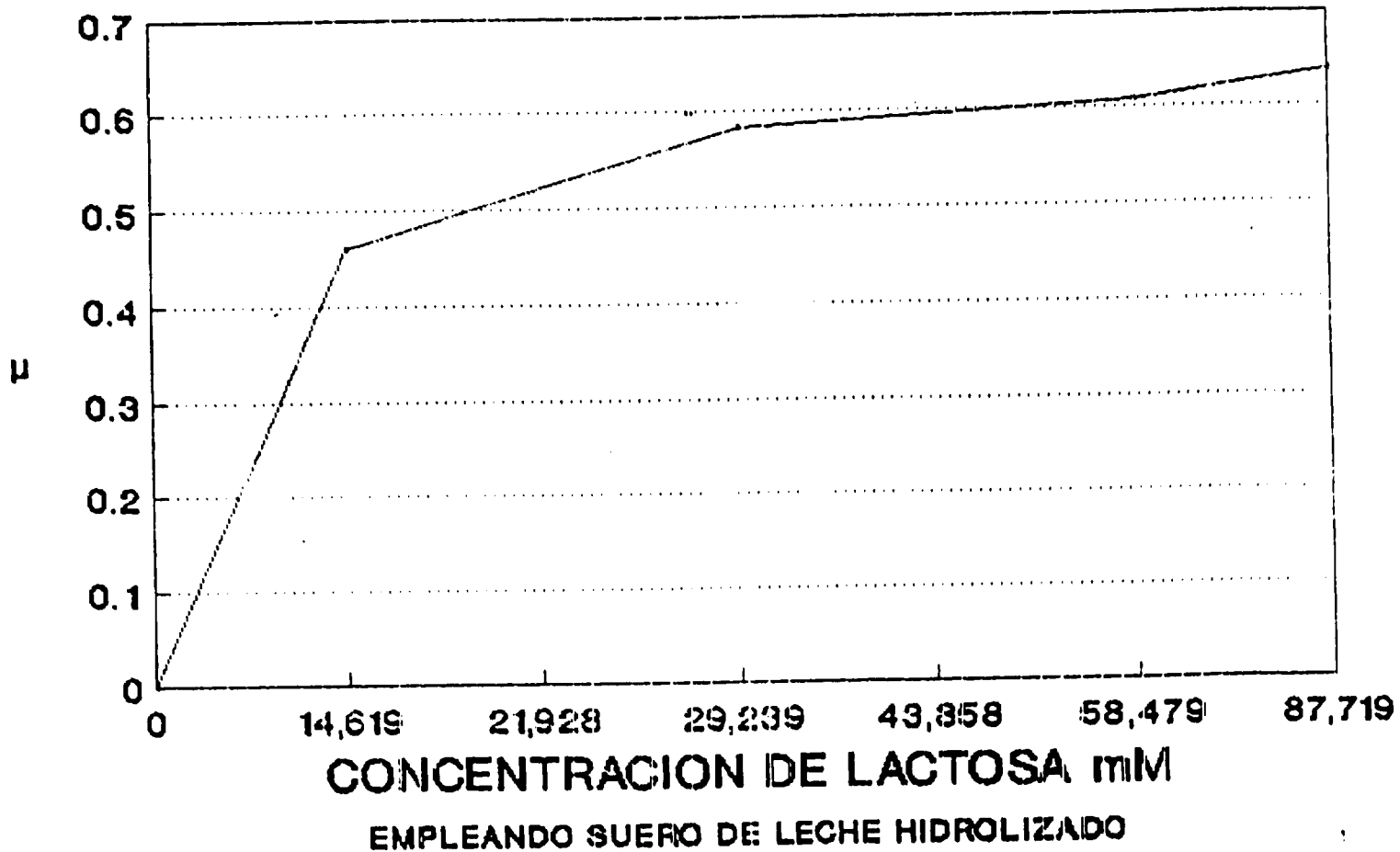
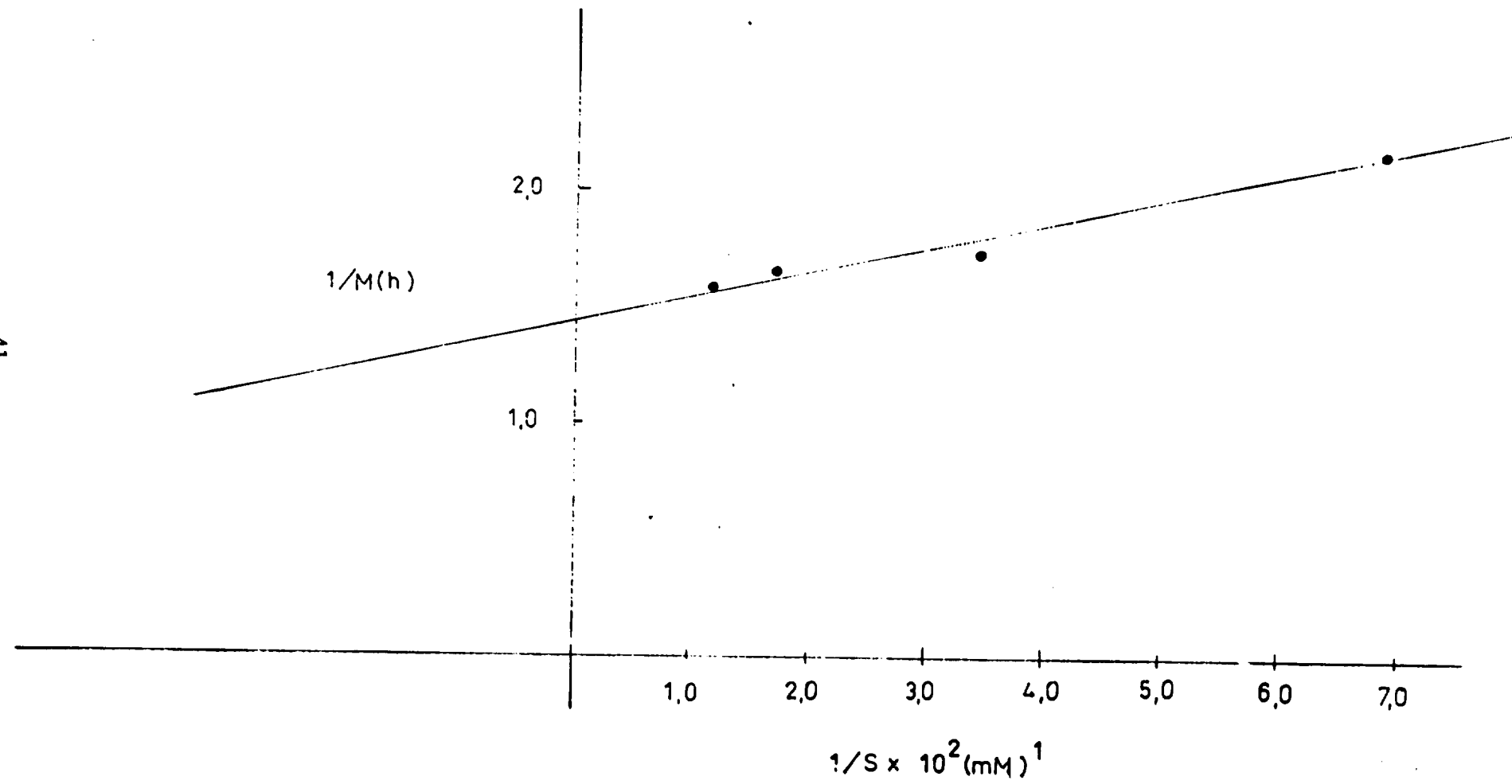


FIGURA NO. 12

FIGURA No 13 Determinación de las constantes cinéticas K_s y M_{max} de K fragilis empleando suero hidrolizado de leche.



Al graficar los inversos de la velocidad específica de crecimiento contra los inversos de la concentración de sustrato (figura No 13) se obtiene un valor de K_s de 7,30 y μ_{max} de 0,697 horas.⁻¹

CONCLUSIONES

- 1-.Puede sustituirse, la lactosa presente en el medio de referencia, por suero de leche como única fuente de carbono, sin afectar de manera significativa la masa microbiana producida y la actividad enzimática. Con esta sustitución se disminuyen los costos de formulación del medio de cultivo.
- 2-.La utilización del suero de leche hidrolizado, como único constituyente del medio de crecimiento de *K. fragilis* no es suficiente para un adecuado crecimiento y producción de la enzima β -galactosidasa.
- 3-.Dentro del rango de experimentación estudiado, se detectó que el medio de cultivo más apropiado tiene la siguiente composición: 5% (p/v) de lactosa (proveniente de 7.8% (p/v) de suero de leche en polvo, hidrolizado), 1% (v/v) licor de remojo de maíz 1% (v/v), 0.42% (p/v) sulfato de amonio, 0.45% (p/v) fosfato dibásico de potasio, 0.05% de sulfato de magnesio (Medio No. 10). Ello es posible, dado que:
 - La actividad específica de la enzima β -galactosidasa es similar a la obtenida con el medio de referencia.
 - Se incrementa la actividad enzimática por litro de cultivo.
 - Se logra una reducción en el costo del medio de cultivo al sustituir el extracto de levadura y al reducir a la mitad la cantidad de sulfato de amonio.

4.-Los valores obtenidos para las constantes cinéticas de *K. fragilis* empleando medio de referencia fueron: $K_S = 5,34 \text{ mM}$ y $\mu_{\text{max}} = 0,63 \text{ h}^{-1}$.

5. Al determinar las constantes cinéticas de *K. fragilis* empleando el medio formulado No 10, se encontró un K_S de $7,30 \text{ mM}$ y un μ_{max} de $0,697 \text{ h}^{-1}$.

BIBLIOGRAFIA

1. A.O.A.C. (1970). Official Methods of Analysis, 11 th ed. Association of Official Analytical Chemistry, Washington DC, USA, p 128.
2. A.O.A.C. (1975) Official Methods of Analysis, 12 th ed. Association of Official Analytical Chemistry, Washington DC, USA. p 575/574
3. Bahar, Susan, Comunicación Personal a L. Revel-Chion (1990).
4. Scott, M. E. & Melvin, E. H. (1953). Determination of Dextran with Anthrone. Anal. Chem. 25 : 1656-1661.

APENDICE A

VALORES OBTENIDOS EN EL DESARROLLO DE LOS EXPERIMENTOS

TABLA A.1 ACTIVIDAD DE LA β GALACTOSIDASA POR GRAMO DE CELULA.

MEDIO	ACTIVIDAD A LAS 3 HORAS	ACTIVIDAD A LAS 6 HORAS
1	7110	4160
2	4759	3755
3	4545	3465
4	5380	4405
5	3330	3350
6	5818	4670
7	5930	4690
8	5900	5060
9	7695	4335
10	6319	5097

TABLA A.2 ACTIVIDAD DE LA β GALACTOSIDASA POR LITRO DE CULTIVO.

MEDIO	ACTIVIDAD A LAS 3 HORAS	ACTIVIDAD A LAS 6 HORAS
1	5808	12.504
2	5701	14.222
3	5358	10.206
4	6364	11.728
5	5524	12.502
6	6504	14.232
7	6611	13.572
8	7311	20.400
9	7695	15.477
10	7382	20.501

TABLA A.3 BIOMASA OBTENIDA DURANTE LA FERMENTACION
EN mg/ml.

MEDIO	BIOMASA A LAS 3 HORAS	BIOMASA A LAS 6 HORAS
1	0,817	3,030
2	1,198	4,229
3	1,179	3,519
4	1,183	2,977
5	1,561	3,732
6	0,954	3,503
7	0,954	3,351
8	1,240	4,480
9	1,000	4,020
10	1,162	4,022

TABLA A.4 RESULTADOS OBTENIDOS EN EL CRECIMIENTO DE *K. fragilis* EN FERMENTADOR DE 7 LITROS EMPLEANDO MEDIO DE REFERENCIA.

TIEMPO (h)	ACTIVIDAD ENZIMATICA U/g	LACTOSA RESIDUAL mg/ml	BIOMASA mg/ml
0	3060	49,72	0,451
1	4050	51,37	0,512
2	3713	48,30	0,955
3	4358	39,66	1,245
4	2640	38,58	1,809
5	2641	25,46	2,433
6	2655	17,02	3,366
7	2738	11,55	4,205
8	2920	2,79	4,923
9	3590	1,20	5,931
10	2940	1,20	5,900

TABLA A.5 RESULTADOS OBTENIDOS EN EL CRECIMIENTO DE *K. fragilis* EN FERMENTADOR DE 7 LITROS EMPLEANDO COMO FUENTE DE LACTOSA SUERO DE LECHE EN POLVO AL 5%

TIEMPO (h)	ACTIVIDAD ENZIMATICA U/g	LACTOSA RESIDUAL mg/ml	BIOMASA mg/ml
0	2691	30,308	0,508
1	4286	22,825	0,888
2	3706	15,864	1,666
3	3706	11,490	2,129
4	4040	7,246	2,567
5	4041	4,565	3,745
6	4495	3,723	3,305

TABLA No A.6 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS DE *Kluveromyces fragilis* EMPLEANDO LACTOSA COMERCIAL COMO FUENTE DE CARBONO.

CONCENTRACION DE LACTOSA		0,075%		0,15%		0,35%	
TIEMPO (h)	DO.	B.	DO.	B.	DO.	B.	
0	0,029	313,4	0,030	328,7	0,029	311,4	
0,5	0,032	359,2	0,030	328,7	0,033	374,4	
1,0	0,036	420,2	0,036	420,2	0,037	435,5	
1,5	0,039	466,0	0,040	481,3	0,041	496,6	
2,0	0,045	557,6	0,042	511,8	0,046	572,9	
3,5	0,057	740,8	0,061	801,9	0,079	1076,6	
4,0	0,061	801,9	0,070	939,2	0,083	1137,7	
4,5	0,059	771,3	0,070	939,2	0,089	1229,3	
CONCENTRACION DE LACTOSA		0,45%		0,70%			
TIEMPO (h)	DO.	B.	DO.	B.	DO.	B.	
0	0,030	328,7	0,032	359,2			
0,5	0,034	389,7	0,035	405,0			
1,0	0,037	435,5	0,039	466,0			
1,5	0,045	557,6	0,046	572,9			
2,0	0,050	633,9	0,051	649,2			
3,5	0,093	1290,3	0,100	1390,2			
4,0	0,102	1427,7	0,120	1762,5			
4,5	0,103	1443,0	0,123	1748,3			

DO. = DENSIDAD OPTICA A 650nm

B. = BIOMASA (mg/l).

TABLA No A.7 DETERMINACION DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO (μ) EMPLEANDO LACTOSA COMERCIAL.

CONCENTRACION DE SUSTRATO. (mM)	VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO (μ) (h^{-1})	$1/S_1$ (mM $^{-1}$)	$1/\mu$ (h)
2,193	0,1894	0,4559	5,280
4,386	0,2994	0,2280	3,340
10,234	0,4206	0,0977	2,378
13,158	0,4738	0,0759	2,111
20,468	0,5110	0,0489	1,957

$r = 0,9995$

$K_g = 5,3420 \text{ mM}$

$\mu_{max} = 0,6532 \text{ (h}^{-1}\text{)}$

TABLA No A.8 CINETICA DE CRECIMIENTO DE *K. fragilis* EMPLEANDO SUERO HIDROLIZADO DE LECHE CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LACTOSA.

CONCENTRACION DE LACTOSA								
	14,619 mM		29,239 mM		58,479 mM		87,719 mM	
TIEMPO (h)	DO.	B.	DO.	B.	DO.	B.	DO.	B.
0	0,035	404,9	0,034	389,7	0,041	496,5	0,030	328,6
1	0,031	343,9	0,036	420,2	0,035	404,9	0,041	476,5
2	0,049	618,6	0,047	588,1	0,052	664,0	0,050	633,9
3	0,130	1855,1	0,139	1992,5	0,143	2053,5	0,141	2023,0
4	0,110	1549,8	0,132	1885,7	0,155	2236,8	0,157	2267,3
5	0,116	1641,4	0,202	2954,2	-	-	0,204	2984,7
6	0,131	1870,4	0,151	2175,6	0,229	3366,3	0,264	3900,6

DO.= DENSIDAD OPTICA A 650nm

B.= BIOMASA (mg/l).

TABLA No A.9 DETERMINACION DE K_S Y μ_{max} DE *k. fragilis* EMPLEANDO SUERO DE LECHE HIDROLIZADO. (MEDIO DE CULTIVO G)

CONCENTRACION DE LACTOSA (mM)	VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO (h^{-1})	1/S (mM^{-1})	1/ μ (h)
14,619	0,4592	0.0684	2,1777
29,239	0,5826	0,0342	1,7164
58,479	0,6073	0,0171	1,6466
87,719	0,6372	0,0114	1,5694

$r = 0,998$

$K_S = 7,3014 \text{ mM}$

$\mu_{max} = 0,6972 \text{ (h}^{-1}\text{)}$

TABLA No A.10 CONSTANTES CINETICAS DE K. fragilis AL EMPLEAR MEDIO DE REFERENCIA Y EL MEDIO FORMULADO No 10

	k_s (ml)	μ_{max} (h ⁻¹)
MEDIO DE REFERENCIA	5,34	0,6532
MEDIO FORMULADO No10	7,30	0,6972

INMOVILIZACION DE B-GALACTOSIDASA EN NYLON

1-.INTRODUCCION

En esta sección, se presentan los resultados obtenidos en la inmovilización de la enzima comercial Lactozym (suministrada por la empresa NOVO Enzyme) sobre nylon. Estos experimentos fueron necesarios, dado que se requiere comparar la actividad y estabilidad de la enzima inmovilizada de origen comercial con la enzima inmovilizada, proveniente del cultivo de *Klyveromyces fragilis*. Esta comparación se hace necesaria para determinar la influencia de los costos de producción, inmovilización y viabilidad del catalizador biológico obtenido. Cabe destacar que el tiempo de vida medio de la preparación, en almacenamiento con reutilizaciones sucesivas, fué de aproximadamente cuatro días para uno de los tipos de preparación obtenidos.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIALES.

- Acido Clorhídrico 37% de pureza, $d = 1,19$ g/cc.
(Riedel de Häen).
- Glutaraldehido grado No 2 al 25% en solución acuosa.
(SIGMA Chemical Company).
- Polietilenimina al 50% en solución acuosa.
(SIGMA Chemical Company).
- Ortonitrofenil β -D Galactopiranosido (SIGMA Chemical Company).
- 2- Mercaptoetanol (Riedel de Häen).
- Nylon brillante. Suministrado por Hilados FLEXILON C.A.
- Bolsas de diálisis.
- β - galactosidasa marca Lactozym 3000 L . HP-6.
(Suministrado por NOVO Industry A/S. Copenhagen-Dinamarca).

2.1.1 SOLUCIONES Y REACTIVOS EMPLEADOS

- Solución de Glutaraldehido al 18,5% (v/v) preparado en buffer de borato 0,74M pH 9,0.
- Solución de Glutaraldehido al 5% (v/v) preparado en buffer borato 0,2M pH 8,5.
- Solución de Polietilenimina al 10% (v/v)

- Buffer para determinación de actividades de la enzima B-galactosidasa: Fosfato de potasio 0,1M pH 6,6 conteniendo 1mM de Mg y 0,1mM de Mn
- Buffer utilizado en el lavado y almacenamiento de los biocatalizadores y en la diálisis y dilución de la enzima comercial: Buffer de fosfato de potasio 0,1M pH 6,6 con 0,1mM de Mn.
- Solución 0,068 M de ONPG.
- Solución 0,036 M de 2-Mercaptoetanol.

2.1.2 EQUIPOS.

- Agitador orbital para tubos de ensayo.
- Platina con agitación marca Corning MCC. PC-520
- Calentador de agua marca Tempette TE-7.
- Molino de cuchillas Modelo No. 4. (Arthur H. Thomas Co. Philadelphia P.A. USA).
- Incubadora con agitación Modelo G 24. suministrada por New Brunswick Scientific Co., nc. Edison, N. J., USA.

2.2 INMOVILIZACION DE B-GALACTOSIDASA EN NYLON .

2.2.1 MOLIENDA DEL NYLON.

Con el propósito de disminuir el tamaño de partícula se colocó un peso de nylon en forma de "chips" en un molino Arthur Thomas Mod No 4. Al finalizar la molienda del nylon, el producto obtenido fué tamizado empleando una de malla de 1.55 mm.

Para la realización de los experimentos se utilizaron las partículas de nylon retenidas en la malla con un tamaño mínimo de 1,55 mm.

2.2.2 ACTIVACION DEL NYLON.

En la realización de los experimentos se usaron 0,25; 0,50; 0,75; y 1 g de nylon. La activación del nylon molido (sección 2.2.1) se realizó según la metodología descrita en el primer informe de avance (1989).

2.2.4 PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LA ENZIMA.

La enzima comercial utilizada en los experimentos de inmovilización en nylon fué la Lactozym 3000 L HP-6. Con la finalidad de obtener resultados comparativos con la inmovilización de la enzima extraída por disrupción celular.

(informe de 1989). Se utilizó una dilución de Lactozym tal que la concentración final fuese de 10 y 5 mg de proteína por ml (preparaciones No 1 y No 2). Igualmente, se utilizó la preparación comercial dializada, diluida hasta obtener 2 mg de proteína por ml (preparación No 3).

La diálisis de la enzima comercial, se llevó a cabo para determinar el efecto del glicerol (y otros aditivos presentes en el producto) sobre la inmovilización y expresión de la actividad enzimática.

La diálisis de la enzima comercial se realizó en buffer de fosfato de potasio 0,1 M pH 6.6 con 0,1 mM de Mn a una temperatura de 4 °C por un periodo de 24 h con agitación ligera. A cada una de las preparaciones obtenidas se le determinó el contenido de proteínas solubles según el método de Lowry (1951) y la actividad enzimática empleando ONPG como sustrato. La determinación de la actividad enzimática se realizó conforme a la metodología descrita en el primer informe de avance (1989).

2.2.5 INMOVILIZACION DE LAS PREPARACIONES ENZIMATICAS

La inmovilización de la enzima comercial (preparaciones Nos. 1, 2 y 3) se realizó mediante la exposición

de 2.0 ml (por duplicado) de la enzima líquida con cada uno de los pesos de soporte activados, usando para ello tubos de ensayo de 100x16 mm. La reacción de inmovilización se llevó a cabo durante un período de 24 horas a una temperatura de 49C y con agitación orbital.

2.2.5 DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE ENZIMA INMOVILIZADA.

El contenido de proteína presente en las preparaciones enzimáticas se determinó, mediante el método de Lowry (1957). La cantidad de enzima inmovilizada (mg) se obtuvo por diferencia algebraica entre la concentración de proteínas al inicio de la reacción de inmovilización y la obtenida al final de la misma.

2.2.6 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LACTASICA DE LOS BIOCATALIZADORES

La actividad enzimática de los biocatalizadores se determina utilizando el siguiente procedimiento: se adiciona de manera individual a cada erlenmeyer, un peso determinado del biocatalizador obtenido. En dicho recipiente, previamente se ha colocado la mezcla de reacción, constituida por 39,2 ml buffer fosfato (0.1 M pH 6,6 con 1 mM de Mg y 0,1 mM de Mn) y 1,4 ml de solución de 2-mercaptoetanol. Seguidamente se incuba la preparación a 309C por

un periodo de 15 minutos al cabo del cual se adiciona 1.4 ml de solución de ONPG 0.155 M. Después se adiciona el sustrato, y se extraen alícuotas de 3 ml al cabo de 0, 1, 2 y 4 minutos, y se someten a ebullición por un periodo de 5 minutos. Finalmente se determina la densidad óptica (D.O.) de las alícuotas a 410 nm.

2.2.7 ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DE LOS BIOCATALIZADORES

Los biocatalizadores obtenidos según la metodología explicada en la sección 2.2.5 al emplear las preparaciones No. 2 y No. 3, se almacenaron para su conservación a una temperatura de 4°C en buffer fosfato de potasio 0.1 M pH 6.6 con 0.1 mM de Mn.

Diariamente, y cada muestra, se le determinó la actividad lactásica de los biocatalizadores según la metodología descrita en la sección 2.2.7.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 INMOVILIZACION DE β -GALACTOSIDASA POR ACOPLAMIENTO COVALENTE EN NYLON

3.1.1 CARACTERIZACION DE LAS PREPARACIONES ENZIMATICAS.

La tabla No. 1 muestra los resultados obtenidos en la caracterización de la enzima comercial no dializada y de la preparación enzimática dializada. En los resultados obtenidos se aprecia la influencia del proceso de diálisis sobre la concentración de proteínas solubles y sobre la actividad específica. La disminución en la concentración de proteínas solubles es una consecuencia directa del proceso de dilución que ocurre en el interior de la bolsa de diálisis, ya que incrementa la cantidad de buffer en contacto con la enzima. Por otra parte, la disminución en la actividad específica de la preparación dializada sugiere la presencia de compuestos o de sustancias (glicerol) en la preparación enzimática original que estabilizan la enzima en solución e incrementan su actividad.

La tabla No. 2 resume la concentración de proteínas solubles presentes en las preparaciones enzimáticas empleadas en la inmovilización. Estas diluciones fueron obtenidas usando

TABLA N° 1 CONCENTRACION DE PROTEINAS SOLUBLES Y ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS PREPARACIONES ENZIMATICAS

PREPARACION ENZIMATICA	CONCENTRACION DE PROTEINA SOLUBLE (mg/ml)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg de proteina)
LACTOZYM 3000L HP-G	30,38	169,35
LACTOZYM 3000L HP-G DIALIZADA	12,68	31,43

TABLA N° 2 CONCENTRACION DE PROTEINAS SOLUBLES DE LAS PREPARACIONES ENZIMATICAS UTILIZADAS EN LA INMOVILIZACION.

		CONCENTRACION DE PROTEINAS SOLUBLES (mg/ ml).
LACTOZYM 3000L HP-G	PREPARACION 1	9,92
	PREPARACION 2	3,67
LACTOZYM 3000L HP-G DIALIZADA	PREPARACION 3	2,04

buffer fosfato conteniendo 0,1 mM de Mn, el cual presenta un efecto positivo en el mantenimiento de la actividad enzimática.

3.1.2 INMOVILIZACION DE LACTOZYM 3000L HP-G

Los resultados obtenidos en la inmovilización de Lactozim 3000 L HP-G (preparaciones 1 y 2) se muestran en las tablas Nos. 3 y 4. Para cada preparación se estudió la influencia del peso de soporte sobre la cantidad de enzima inmovilizada. En ambos casos se aprecia que al incrementar el peso de soporte aumenta la cantidad (mg) de proteína inmovilizada. Así, para las preparaciones No. 1 y 2 el mayor porcentaje de proteína inmovilizada (86,2% y 91,4%) se obtiene al emplear un peso de soporte de 1,0 g (ver figuras No 1 y 2).

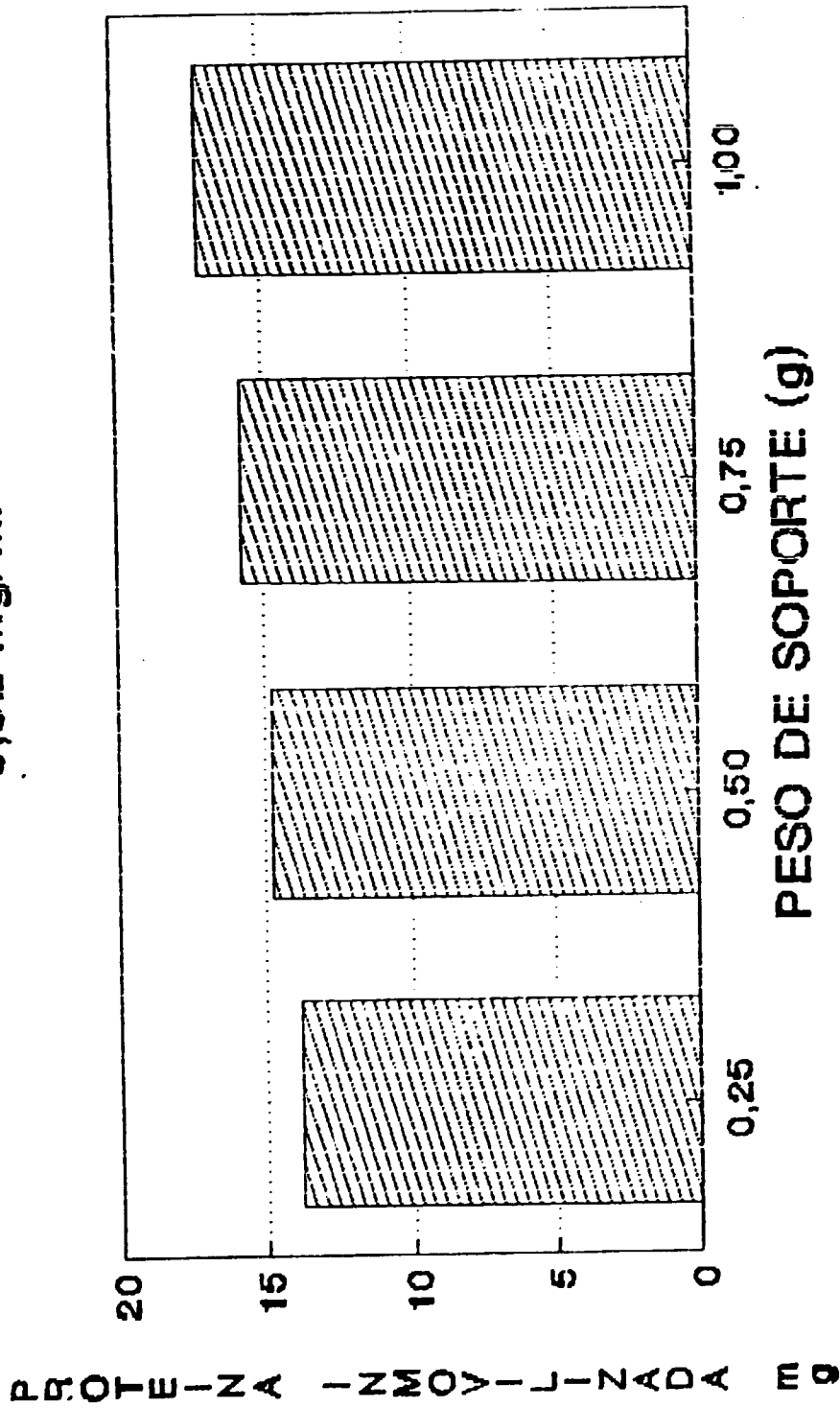
Por otra parte, la concentración inicial de enzima en la reacción de inmovilización tiene influencia sobre la cantidad (mg) de proteína inmovilizada. En efecto, al aumentar la concentración inicial de proteína de 3,67 a 9,92 mg/ml en la reacción de inmovilización, incrementa la cantidad de proteína inmovilizada/g de soporte para cada uno de los pesos de soporte utilizados. Así, al emplear la preparación No. 1 (9,92 mg/ml) se obtiene 55,2 , 29,4 , 20,92 y 17,10 mg de proteína inmovilizada/g de soporte para los pesos 0,25 , 0,50 , 0,75 y 1,00 g respectivamente, mientras que para la preparación No 2 (3,67

TABLA No 3 INMOVILIZACION DE LA PREPARACION ENZIMATICA 1 (LACTOZYM 3000L HF-6 CONCENTRACION INICIAL DE ENZIMA DE 9,92 mg DE PROTEINA / ml).

	PESO DE SOPORTE			
	0,25	0,50	0,75	1,00
CANTIDAD DE PROTEINA ANTES DE LA INMOVILIZACION (mg/2ml)	19,84	19,84	19,84	19,84
CANTIDAD DE PROTEINA DESPUES DE LA INMOVILIZACION (mg/2ml)	6,03	5,13	4,15	2,74
CANTIDAD DE PROTEINA INMOVILIZADA (mg)	13,81	14,71	15,69	17,10
mg DE PROTEINA INMOVILIZADA/g DE SOPORTE	55,24	29,42	20,92	17,10
% PROTEINA INMOVILIZADA	69,60	74,12	79,09	86,18
UNIDADES DE PROTEINA AL INICIO DE LA INMOVILIZACION	3359,9	3359,9	3359,9	3359,9
UNIDADES DE PROTEINA INMOVILIZADA	2338,72	2490,14	2657,10	2895,89
ACTIVIDAD TEORICA (mg DNPG/min)	704,66	750,58	800,00	872,53
ACTIVIDAD REAL (mg DNPG/min)	0,040	0,558	0,563	1,281
UNIDADES EXPRESADAS	0,13	1,85	1,87	4,25
% DE UNIDADES EXPRESADAS	0,01	0,07	0,07	0,15

PROTEINA INMOVILIZADA

CONCENTRACION INICIAL DE ENZIMA
9,92 mg/ml



Cantidad de proteína Inmovilizada
para los diferentes pesos de soporte
al emplear la preparación No 1

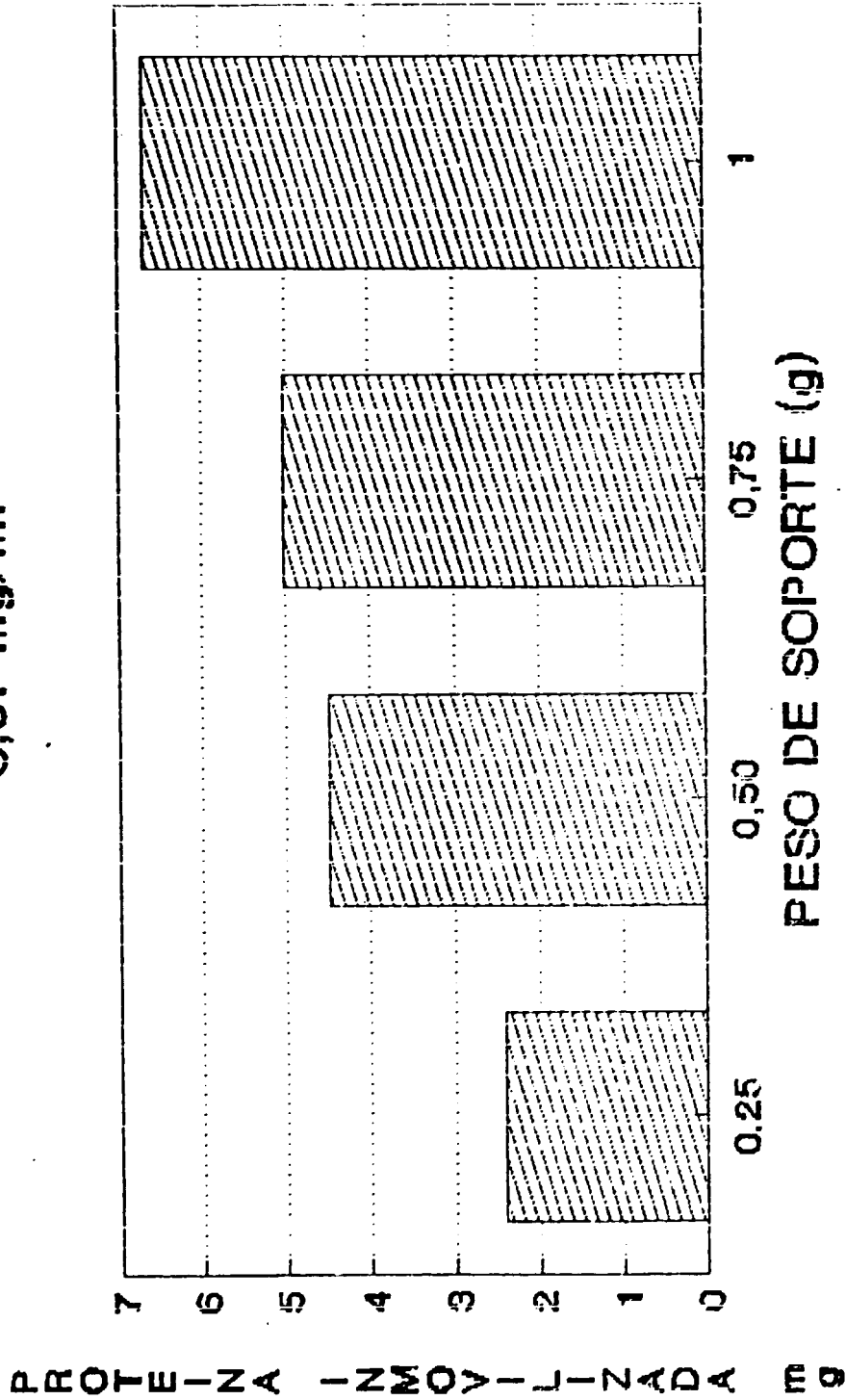
TABLA No 4 INMOVILIZACION DE LA PREPARACION ENZIMATICA No 2
(LACTOZYM 3000L HP-6 CONCENTRACION INICIAL DE
ENZIMA DE 3,67 mg DE PROTEINA / ml)

	PESO DE SOPORTE (g)			
	0,25	0,50	0,75	1,00
CANTIDAD DE PROTEINA ANTES DE LA INMOVILIZACION (mg/2ml)	7,34	7,34	7,34	7,34
CANTIDAD DE PROTEINA DESPUES DE LA INMOVILIZACION (mg/2ml)	4,92	4,36	2,32	0,63
CANTIDAD DE PROTEINA INMOVILIZADA. (mg)	2,42	2,48	5,02	6,71
mg PROTEINA IMOVILIZADA POR GRAMO DE SOPORTE	9,68	5,96	6,69	6,71
PROTEINA INMOVILIZADA (%)	32,97	40,60	68,39	91,42
UNIDADES DE PROTEINA AL INICIO DE LA INMOVILIZACION	1243,03	1243,03	1243,03	1243,03
UNIDADES DE PROTEINA INMOVILIZADA	409,83	504,66	850,14	1136,34
ACTIVIDAD TEORICA (mg ONP/min)	123,48	152,05	256,15	342,38
ACTIVIDAD REAL (mg ONP/ min)	0,807	2,053	3,214	4,252
UNIDADES EXPRESADAS	2,68	6,82	19,67	14,11
% DE UNIDADES EXPRESADAS	0,65	1,35	1,26	1,24

PROTEINA INMOVILIZADA

CONCENTRACION INICIAL DE ENZIMA

3,67 mg/ml



Cantidad de proteína Inmovilizada
para los diferentes pesos de soporte
al emplear la preparación No 2

FIGURA NO. 2

mg/ml) los valores de proteína inmovilizada por gramo de soporte son inferiores a los que se obtienen al utilizar la preparación No 1. En efecto, sólo se alcanza un valor máximo de 9,68 mg de proteína inmovilizada /g de soporte al emplear un peso de soporte de 0,25 g. De estos resultados se deriva que al aumentar la concentración enzimática enfrentada de 3,67 a 9,90 mg/ml se logran (a excepción del obtenido para 1 gramo de soporte) valores de mg de proteína por gramo de soporte superiores al criterio óptimo establecido (20 mg de proteína/ g de soporte) a pesar de que éstos disminuyen al aumentar los pesos de soporte y por ende la cantidad de proteína inmovilizada. Igualmente, independientemente de los mg de proteína inmovilizada por gramo de soporte se obtuvieron bajos valores de unidades expresadas (ver figura 4). En este caso los resultados registrados para la enzima no dializada sugieren una posible relación entre los bajos valores de unidades expresadas y la presencia de elementos y compuestos estabilizantes en la preparación original.

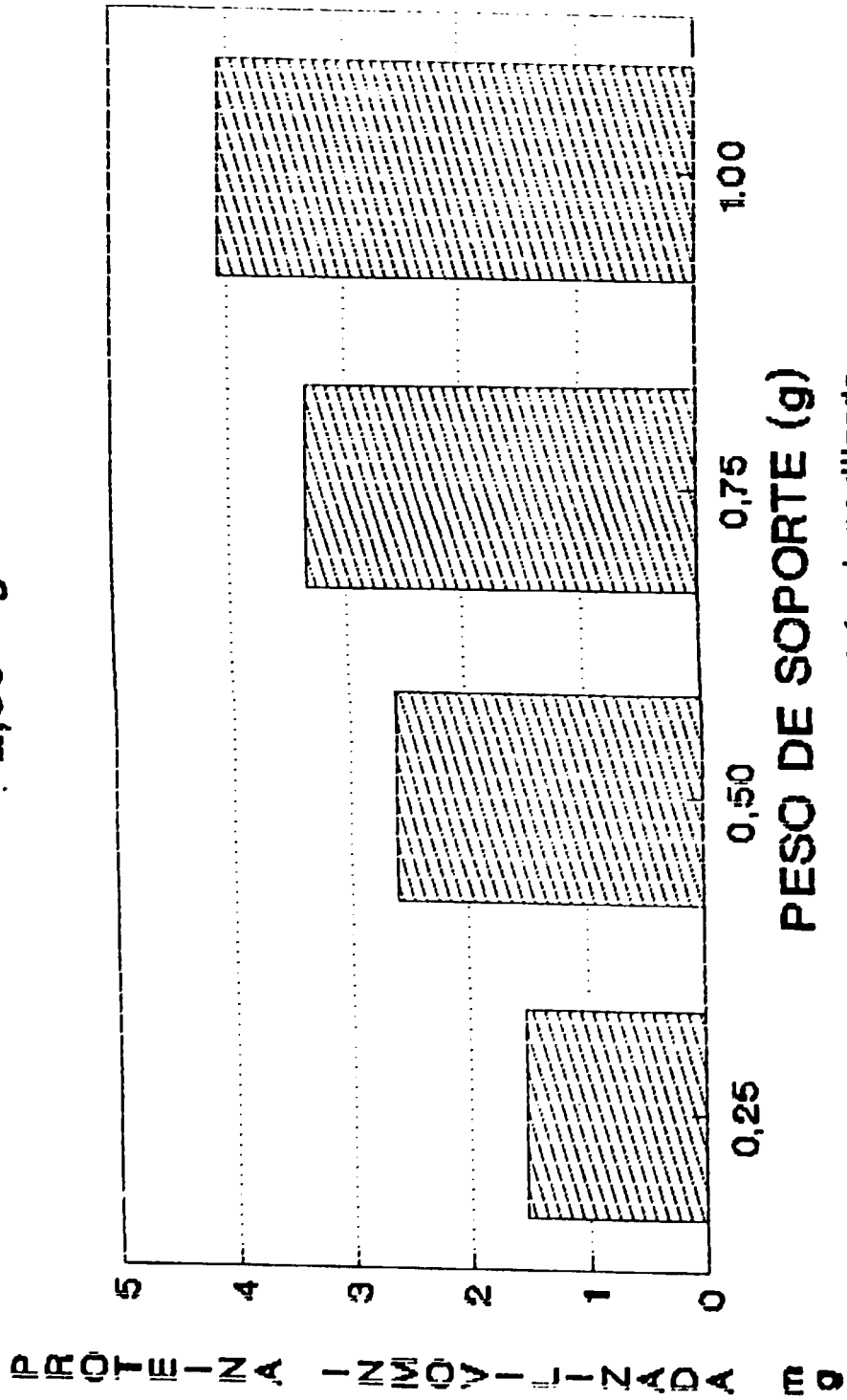
En la figura No 3 se puede observar que al emplear la preparación No 3 existe igualmente un aumento de la cantidad de proteína inmovilizada al incrementar el peso de soporte alcanzando un máximo de 4,07 mg de proteína al emplear un peso de soporte de 1 gramo.

TABLA No 5 INMOVILIZACION DE LA PREPARACION ENZIMATICA No 3
(LACYOZYM 3000L HF-G DIALIZADA).

	PESO DE SOPORTE			
	0,25	0,50	0,75	1,00
CANTIDAD DE PROTEINA ANTES DE LA INMOVILIZACION (mg/2ml)	4,07	4,07	4,07	4,07
CANTIDAD DE PROTEINA DESPUES DE LA INMOVILIZACION (mg/2ml)	2,54	1,47	0,73	0,00
CANTIDAD DE PROTEINA INMOVILIZADA (mg)	1,53	2,60	3,34	4,07
mg DE PROTEINA INMOVILIZADA POR GRAMO DE SOPORTE	6,12	5,20	4,45	4,07
% DE PROTEINA INMOVILIZADA	37,59	63,88	82,06	100,00
UNIDADES DE PROTEINA AL INICIO DE LA INMOVILIZACION	127,92	127,92	127,92	127,92
UNIDADES DE PROTEINA INMOVILIZADA	48,04	81,72	104,98	127,92
ACTIVIDAD TEORICA (mg ONPG / min)	14,49	24,62	31,63	38,54
ACTIVIDAD REAL (mg ONPG/ min)	2,03	3,43	5,99	8,31
UNIDADES EXPRESADAS	6,72	11,39	19,87	27,57
% DE UNIDADES EXPRESADAS	14,01	13,93	18,94	21,56

PROTEINA INMOVILIZADA

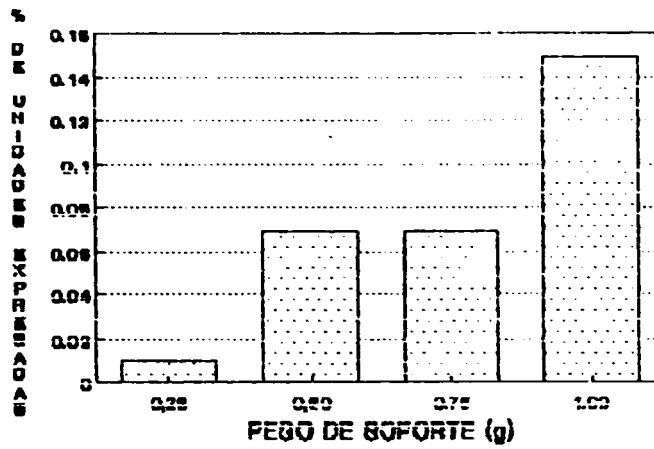
CONCENTRACION INICIAL DE ENZIMA
2,03 mg/ml



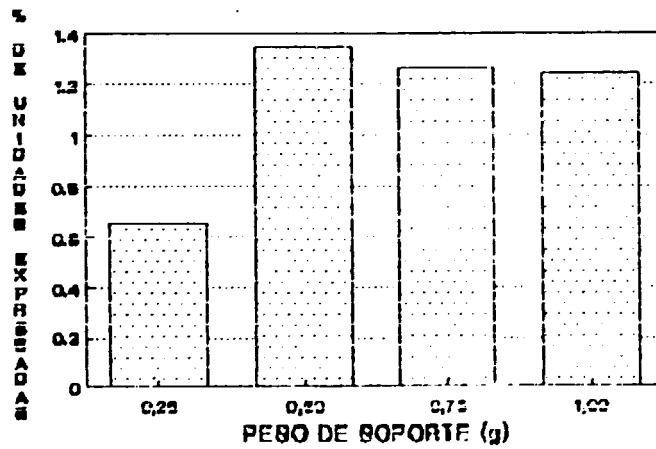
Cantidad de proteína inmovilizada
para los diferentes pesos de soporte
al emplear la preparación No 3

FIGURA No 3

UNIDADES EXPRESADAS AL EMPLEAR LA PREPARACION No 1



UNIDADES EXPRESADAS AL EMPLEAR LA PREPARACION No 2



UNIDADES EXPRESADAS AL EMPLEAR LA PREPARACION No 3

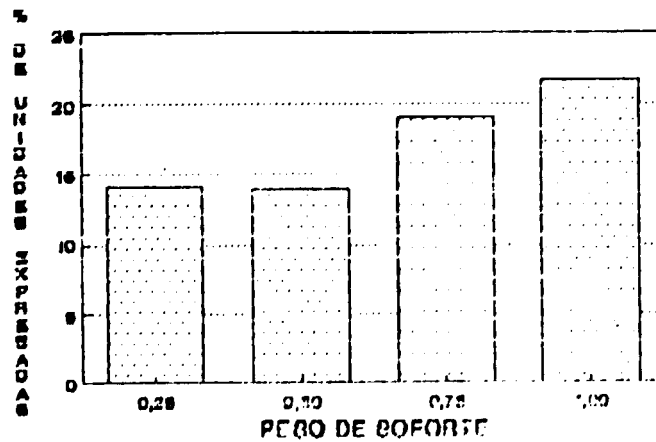


FIGURA NO. 4

Al emplear la preparación No 3 (tabla No 5) se obtienen biocatalizadores con un mayor % de unidades expresadas en comparación a los obtenidos utilizando las preparaciones enzimáticas No.1 y No.2, alcanzando un valor máximo de 21,56% al emplear un peso de soporte de 1 g. Este resultado sugiere que el proceso de diálisis de la enzima previo a la reacción de inmovilización permite incrementar la proporción de proteína activa en relación a la cantidad total de proteína inmovilizada, hecho que es respaldado por los mayores valores de actividad real obtenidos (ver tabla No 5). Sin embargo, la cantidad de proteína inmovilizada por peso de soporte es menor al criterio óptimo establecido. Esto se debe a la baja concentración inicial de enzima dializada empleada en el enfrentamiento.

En este sentido, la optimización del proceso de inmovilización debería ser orientado no solamente en términos de la cantidad de mg. de proteína inmovilizada por gramo de soporte sino también con respecto al porcentaje de unidades expresadas, puesto que los datos sugieren que no existe necesariamente una correspondencia entre ambos parámetros, debiéndose procurar una forma de inmovilización que no afecte la expresión enzimática.

Se ha programado realizar experimentos empleando una mayor concentración de la enzima dializada con la finalidad de incrementar los mg de proteína inmovilizada por gramo de soporte. Igualmente, se está estudiando el efecto de la concentración de

lactosa (durante la reacción de inmovilización) sobre la fijación y expresión de la enzima.

3.1.5 ESTABILIDAD . DE ALMACENAMIENTO . DE LOS BIOCATALIZADORES

Los valores numéricos obtenidos durante el estudio de la estabilidad de los biocatalizadores se indican en las tablas Nos. 6 y 7.

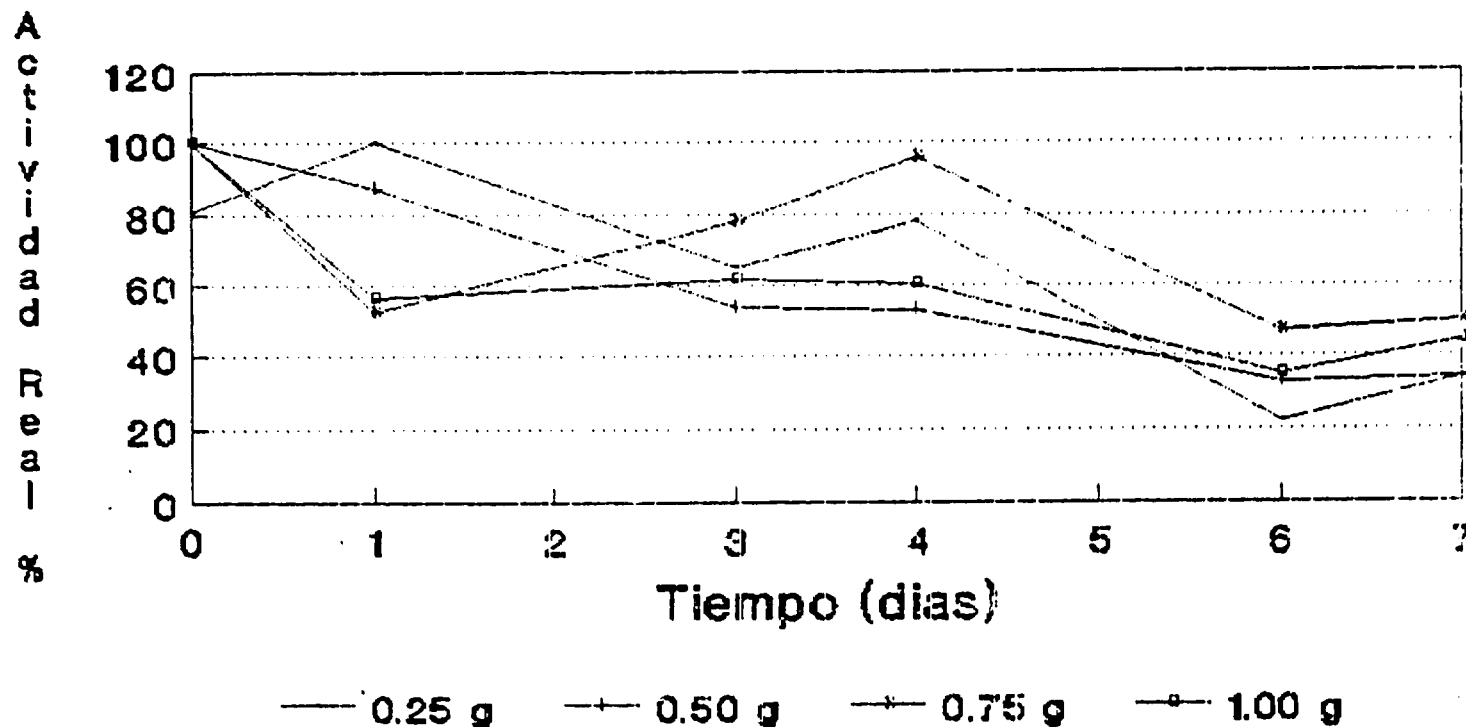
De las preparaciones enzimáticas No. 1 y 2 (no dializadas) se seleccionó la segunda por presentar mayor actividad real (1.28 Vs. 4.25 mg ONPG/min, respectivamente, para el mayor peso de soporte.

Las figuras Nos. 5 y 6 muestran los resultados obtenidos en la determinación de la estabilidad de almacenamiento de los biocatalizadores al emplear las preparaciones enzimáticas Nos. 2 y 3, respectivamente. Para la enzima B-galactosidasa no dializada (preparación No 2) la actividad enzimática mostró estabilidad hasta los 4 días de almacenamiento, a partir del cual disminuye en un 50% aproximadamente, independientemente del peso del soporte; sin embargo, para la preparación enzimática dializada No 3 (figura No 5) se observó el mismo comportamiento a partir del segundo día de almacenamiento.

TABLA No 6 DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DE LOS BIOCATALIZADORES OBTENIDOS AL USAR LA PREPARACION ENZIMATICA No 2.

TIEMPO (h)	PESO DE SOPORTE (g)	ACTIVIDAD REAL (mg ONPG/min)	ACTIVIDAD REAL (%)
0	0,25	0,80	100
	0,50	2,05	100
	0,75	2,07	100
	1,00	4,25	100
24	0,25	1,00	123,92
	0,50	1,79	87,32
	0,75	2,23	52,47
	1,00	2,41	56,71
72	0,25	0,65	80,55
	0,50	1,11	54,15
	0,75	1,62	78,26
	1,00	2,62	61,65
96	0,25	0,78	96,65
	0,50	1,09	53,17
	0,75	1,98	95,65
	1,00	2,57	60,47
144	0,25	0,22	27,26
	0,50	0,67	32,68
	0,75	0,97	46,86
	1,00	1,48	34,82
168	0,25	0,34	42,13
	0,50	0,70	34,15
	0,75	1,04	50,24
	1,00	1,88	44,24

ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DEL BIOCATALIZADOR AL EMPLEAR LA PREPARACION No. 2

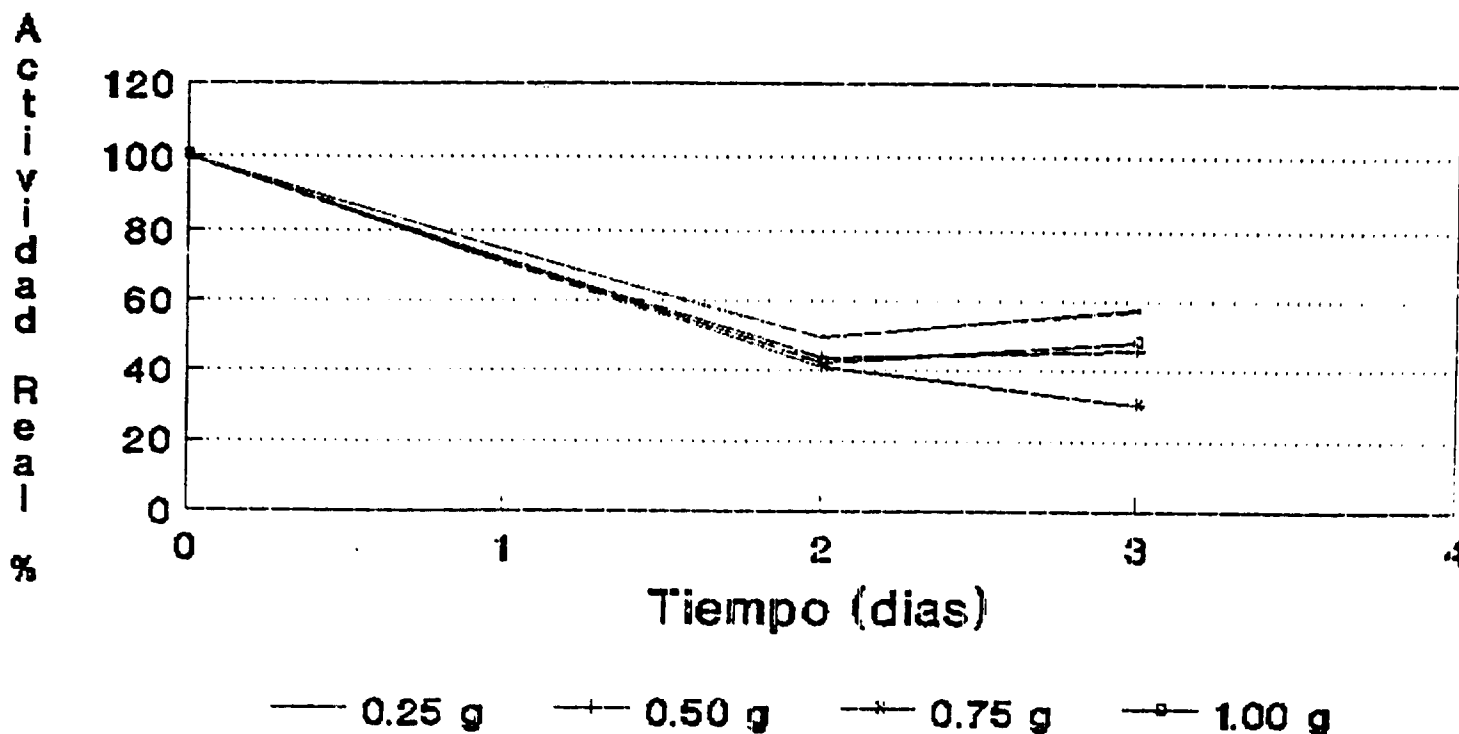


Estabilidad de Almacenamiento
para diferentes pesos de
soporte

TABLA No 7 DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DE LOS BIOCATALIZADORES OBTENIDOS AL EMPLEAR LA PREPARACION ENZIMATICA 3.

TIEMPO (h)	PESO DE SOPORTE (g)	ACTIVIDAD REAL (mg ONPG/min)	ACTIVIDAD REAL (%)
0	0,25	2,03	100
	0,50	3,43	100
	0,75	5,99	100
	1,00	8,31	100
24	0,25	1,00	49,06
	0,50	1,49	43,44
	0,75	2,45	40,90
	1,0	3,97	47,77
72	0,25	1,16	57,19
	0,50	1,57	45,77
	0,75	1,82	30,38
	1,00	3,53	42,48

ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DEL BIOCATALIZADOR AL EMPLEAR LA PREPARACION No. 3



Estabilidad de almacenamiento
para diferentes pesos de
soporte.

FIGURA No 6

4-.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1-.Fuede inmovilizarse la enzima β -Galactosidasa comercial (Lactozym 3000 L HP-B) sobre nylon.
- 2-.La diálisis previa, de la enzima comercial, antes de la reacción de inmovilización permite incrementar la proporción de proteína activa en relación a la cantidad total de proteína inmovilizada.
- 3-.La optimización del proceso de inmovilización debe orientarse, no sólomente hacia la consecución de elevados porcentajes de mg de proteína inmovilizada por gramo de soporte, sino también hacia altos porcentajes de unidades expresadas.

CARACTERIZACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO PRODUCIDO A PARTIR DEL
CULTIVO DE KLYVEROMYCES fragilis Y DE LA PREPARACION ENZIMATICA
COMERCIAL (LACTOZYM)

TABLA DE CONTENIDO

=====

1-.INTRODUCCION	1
2-.MATERIALES Y METODOS	2
2.1-.EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA ENZIMA A PARTIR DEL CULTIVO DE <i>K. fragilis</i>	2
2.2-.ENZIMA COMERCIAL	2
2.3-.DETERMINACION DE K_m Y V_{max}	2
2.3.1-.EXTRACTO ENZIMATICO	2
2.3.1-.LACTOZYM	3
2.4-.ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS SOLUBLES CON RESPECTO A VARIACIONES DE pH Y TEMPERATURA	3
2.4.1-.EXTRACTO ENZIMATICO	3
2.4.2-.LACTOZYM	3
2.5-.DETERMINACION DE LA TEMPERATURA Y pH OPTIMO DE LAS ENZIMAS SOLUBLES	4
2.5.1-.EXTRACTO ENZIMATICO	4
2.5.2-.LACTOZYM	4
2.6-.RESULTADOS Y DISCUSION	5
2.6.1-. K_m Y V_{max}	5
2.6.2-.TEMPERATURA OPTIMA DE LAS ENZIMAS SOLUBLES	8
2.6.3-.ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS SOLUBLES CON RESPECTO A LA TEMPERATURA	8
2.6.4-.EFECTO DEL pH DE REACCION SOBRE LA EXPRESION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE β -GALACTOSIDASA	13
2.6.5-.ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DE β -GALACTOSIDASA CON RESPECTO AL pH	13
2.7-.CONCLUSIONES	20

1-. INTRODUCCION

En esta sección del informe, se presentan los resultados correspondientes a la caracterización de la enzima β -galactosidasa proveniente:

- 1-.del cultivo de *K. fragilis*, luego de etapas de extracción y purificación,
- 2-.de una preparación enzimática comercial (Lactozym), utilizada como referencia (por Chile y Venezuela) en los experimentos de inmovilización. El uso de esta enzima, fué acordado durante la segunda reunión técnica celebrada en Cuernavaca, México, sabiendo de antemano que esta preparación es producida por *K. lactis* y tiene propiedades diferentes; sin embargo, constituye el producto que generalmente es utilizado en la industria de procesamiento de la leche.

En la caracterización, se estudiaron las constantes cinéticas (V_{max} , K_m), pH y temperatura óptima, energía de activación, y estabilidad de almacenamiento a diferentes pH y temperaturas.

Estos experimentos previos, fueron necesarios para la etapa de inmovilización, a fin de comparar las propiedades de la preparación enzimática inmovilizada con la enzima soluble.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1-.EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA ENZIMA A PARTIR DEL CULTIVO DE K.Fragilis

El extracto enzimático, se obtuvo a partir de una fermentación de *K. fragilis*, llevada a cabo, en un fermentador de 4 litros de volumen efectivo. Se aisló la enzima utilizando el procedimiento de extracción y purificación parcial, previamente indicado en el Informe de avance (1989).

2.2-.ENZIMA COMERCIAL:

Se empleó Lactozym, tipo L-3000, suministrada por la empresa NOVO ENZYME, Dinamarca.

2.3-.DETERMINACION DE K_m y V_{max}

Se determinaron las constantes cinéticas del extracto enzimático y la enzima comercial. Para cada caso se emplearon las siguientes concentraciones sustrato (ONPG) y enzima.

2.3.1-.EXTRACTO ENZIMATICO:

		-4	
Concentraciones de ONPG:	5.64x	10	M
	8.47x	10-4	M
	1.13x	10-3	M
	1.69x	10-3	M
	2.26x	10-3	M

Concentración de la enzima: Enzima extraída, diluída 1/100 en buffer de fosfato

2.3.2-.LACTOZYM:

Concentraciones de ONPG:	5.61x	10 ⁻⁴	M
	8.47x	10 ⁻⁴	M
	1.13x	10 ⁻³	M
	1.69x	10 ⁻³	M

Concentración de la enzima: Dilución 1/500 en buffer de fosfato

2.4-.ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS SOLUBLES CON RESPECTO A VARIACIONES DE pH Y TEMPERATURA

2.4.1 EXTRACTO ENZIMATICO

La estabilidad de esta preparación, fué evaluada determinando la actividad de la enzima cada 5 horas, a lo largo de un período de 25 horas, a diferentes temperaturas (5, 25, 40 y 50 °C) manteniendo el pH de la solución en 6.6

Para analizar la influencia del pH sobre la actividad residual, se utilizaron soluciones a pH: 4.7, 5.4, 6.6, 7.0 y 8.4.

En todos los casos, la actividad enzimática fué determinada empleando la metodología descrita en el Informe de avance (1989), usando ONPG como sustrato, 0.1 ml de la enzima apropiadamente diluida, a una temperatura de 40 °C y pH= 6.6

2.4.2-.LACTOZYM

También para esta preparación comercial, se determinó la actividad residual a diferentes temperaturas y pH. Las

condiciones utilizadas fueron las siguientes:

TEMPERATURAS (°C): 4, 27, 40, 45 (pH 6.6)

pH : 4.8, 5.6, 6.6, 7.0, 8.4 (T=40 °C)

empleando la técnica antes descrita (Informe 1989).

2.5-.DETERMINACION DE LA TEMPERATURA Y pH OPTIMO DE LAS ENZIMAS SOLUBLES

2.5.1-.EXTRACTO ENZIMATICO

Se estudió el efecto de estas variables sobre la actividad de la enzima, incubando muestras de la preparación a diferentes temperaturas durante un lapso de 20 minutos. Al final de este período, y empleando la técnica ya descrita, se evaluó la actividad.

Las temperaturas empleadas fueron: 22, 33.5, 37, 40, 45, 50, 55 y 60 °C.

Para calcular la energía de activación, solamente se consideró la porción lineal del gráfico que relaciona el % de actividad enzimática total con la temperatura (rango 22-45 °C).

2.5.2-.LACTOZYM

En este caso se repitieron las experiencias antes señaladas, empleando la enzima comercial de acuerdo a las siguientes condiciones de operación:

TEMPERATURA (°C): 4, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 °C
(Buffer fosfato, pH=6.6)

pH: 4.8, 5.6, 6.6, 7.0, 8.4
(Buffer fosfato, T=40 °C)

La energía de activación fué calculada en el rango de 25-40 °C.

2.6-RESULTADOS Y DISCUSION

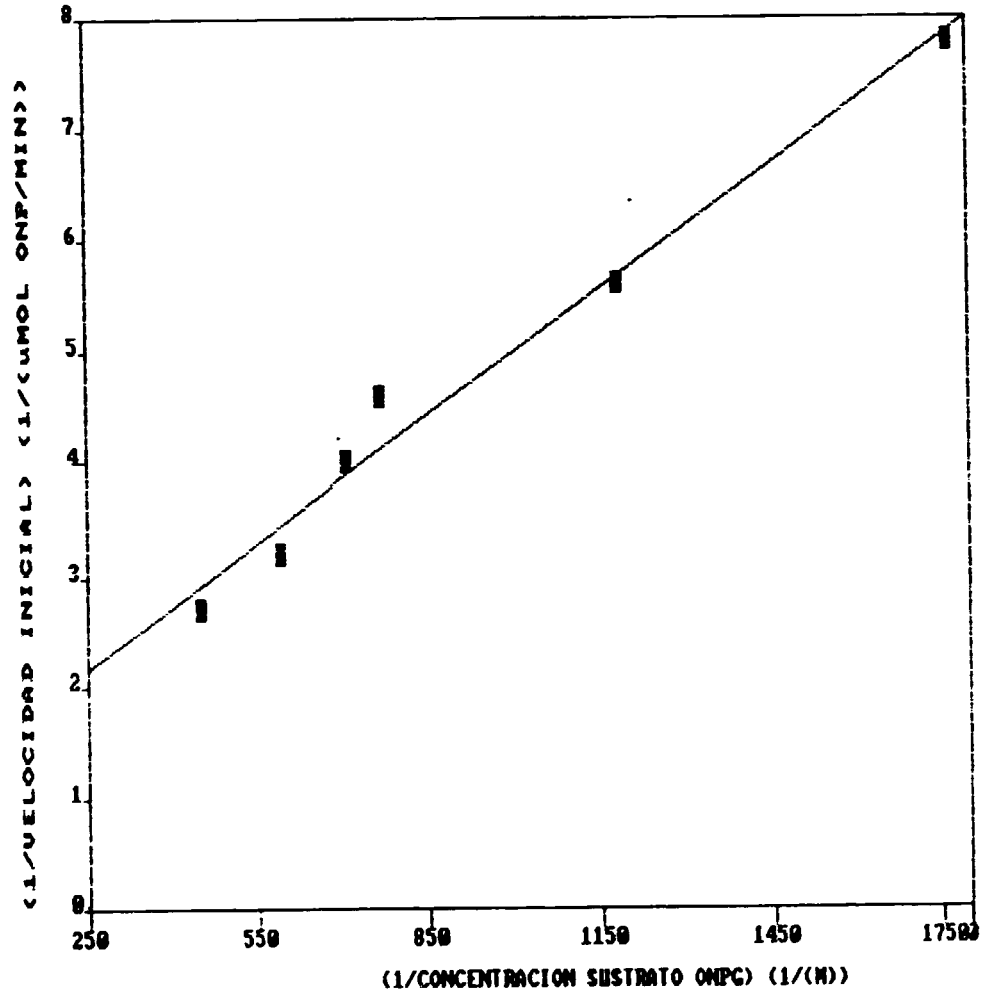
2.6.1-K_m y V_{max}.

Tal como indican los resultados (Ver Figs. No. 1 y 2, Tablas No. 1 y No.2), las constantes cinéticas del extracto enzimático obtenidas fueron $K_m=3.1$ mM y $V_{max}=0.83$ ONP/min, respectivamente. El primero de estos valores corresponde con el obtenido por el grupo de investigación de México ($K_m=3.4$ mM, informe No. 1, pag.27), mientras que la V_{max} es diferente, ya que, en dicho documento se indica que $V_{max}=0.17$ μ mol ONP/min.

En el caso de la preparación comercial (Fig.2), las constantes son: $K_m=3.29$ mM y $V_{max}=1.92$ μ mol ONP/min.

Como puede observarse, los valores de K_m son muy similares para las dos preparaciones, pero la velocidad máxima de la enzima soluble comercial, es mayor que la obtenida del cultivo de *K. fragilis*.

FIG. No. 1-CONSTANTES CINETICAS EXTRACTO

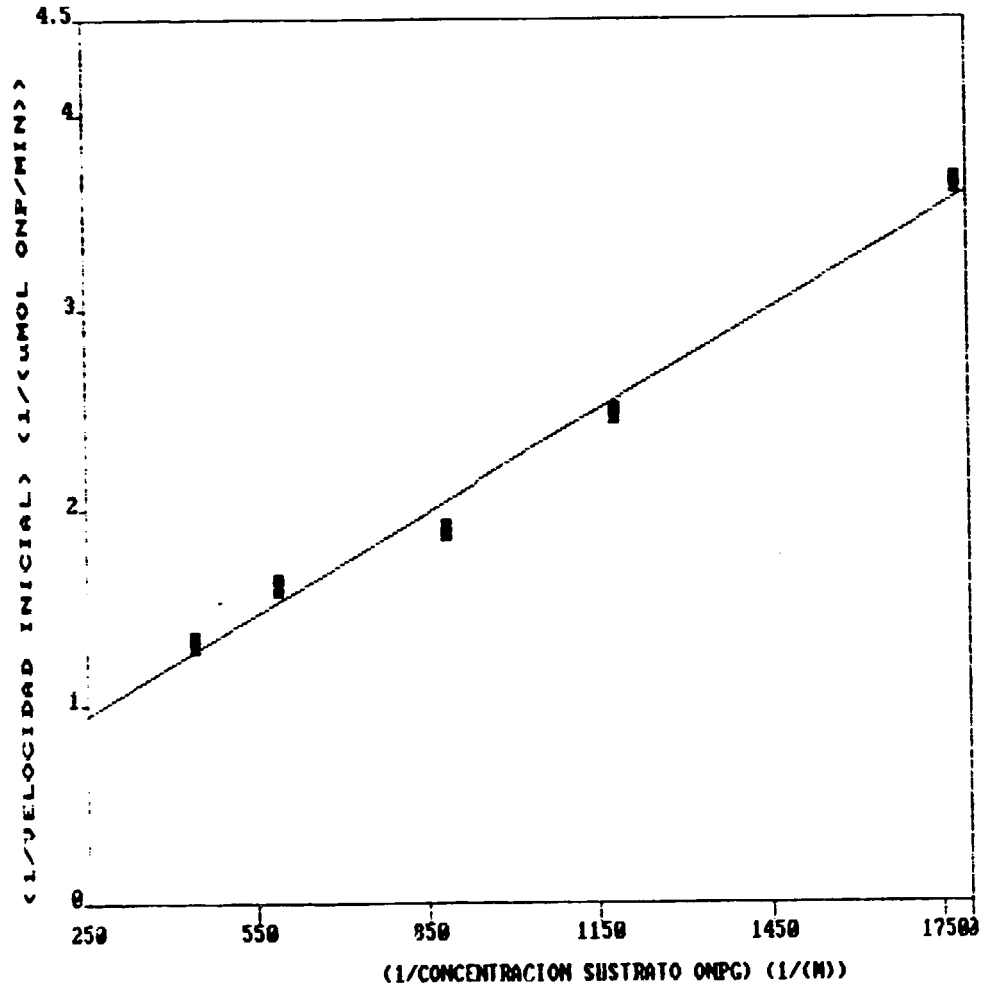


THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$(1.211E+00) + (3.774E-03)*X$$

THE VARIANCE - 6.041E-02

FIG. No. 2-.CONSTANTES CINETICAS LACTOZYM



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$(5.202E-01) + (1.713E-03)*X$$

THE VARIANCE - 7.246E-03

2.5.2. TEMPERATURA OPTIMA DE LAS ENZIMAS SOLUBLES

El análisis de las Figs. No. 3 y 4 (Tablas No. 3 y 4), permite visualizar la existencia de temperaturas óptimas para cada una de las preparaciones solubles (Extracto y Lactozym). En efecto, en la Fig. No. 3, correspondiente al extracto, se observa la existencia de un máximo de actividad a los 45 °C; mientras que en la Fig. No. 4, obtenida empleando Lactozym, el máximo corresponde aproximadamente a 47.5 °C.

La energía de activación del extracto enzimático (Fig. No. 5, Tabla No. 5) derivada de la porción lineal (comprendida entre 22-45 °C), resultó ser de 6.255,48 ca/mol, valor ligeramente superior al obtenido para el Lactozym ($E_a = 6.067,86$ cal/mol) (Fig. No. 6, Tabla No. 6). Estos resultados, son muy similares a los valores experimentales obtenidos por el grupo de investigación de México (5.255 cal/mol).

2.6.3.- ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS SOLUBLES CON RESPECTO A LA TEMPERATURA

En las Figs. No. 7 y 8 (Tablas No. 7 y 8), se presentan los resultados correspondientes a la estabilidad del extracto enzimático y la enzima comercial, respectivamente. Como puede observarse, el extracto enzimático proveniente del cultivo de *K. fragilis*, mantiene su actividad satisfactoriamente a lo largo de período estudiado, si la temperatura se mantiene entre (-5) °C y 40 °C. La discontinuidad obtenida a 25 °C, probablemente sea debida a la contaminación microbiana, que

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PREPARACION COMERCIAL (LACTOZYM)

ACTIVIDAD ENZIMATICA
MOZP / Min

6

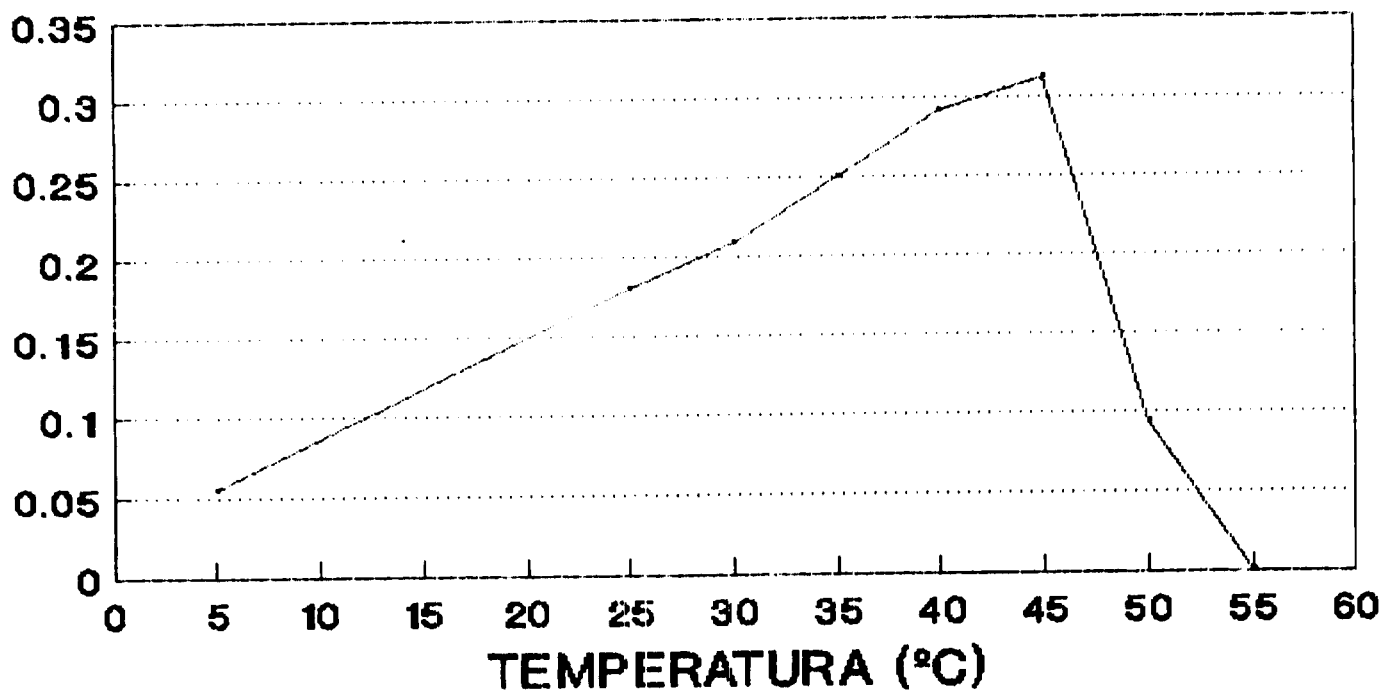


FIGURA No 3

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO

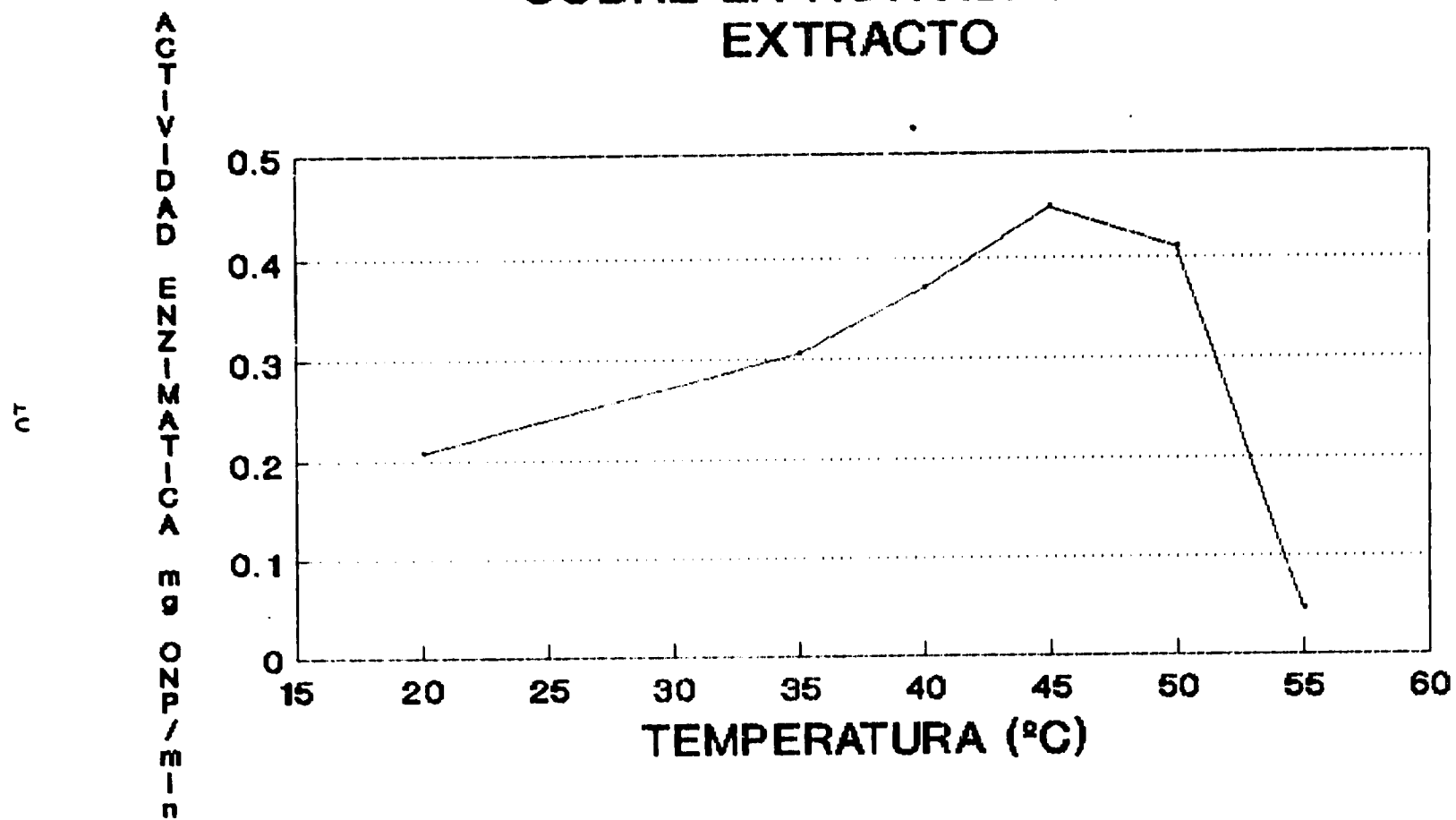
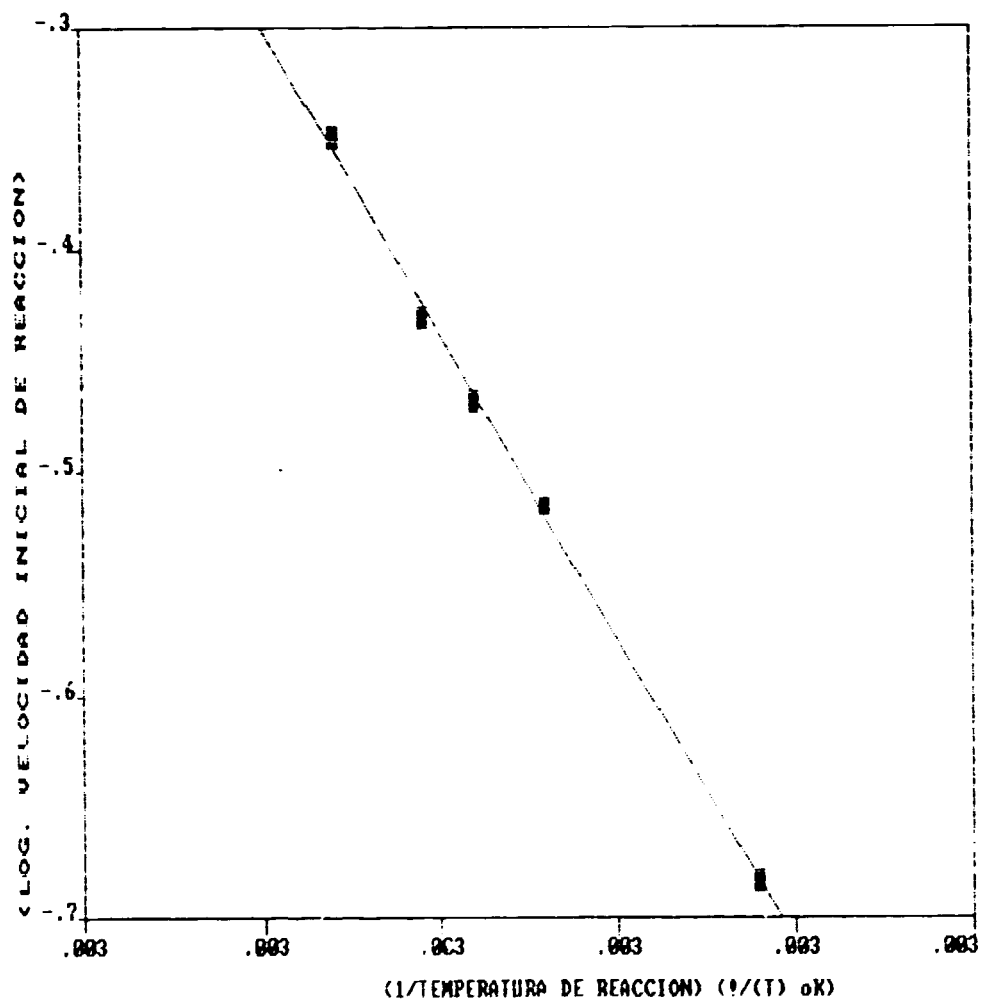


FIGURA No 4

FIG. No. 5-.ENERGIA DE ACTIUACION DEL EXTRACTO

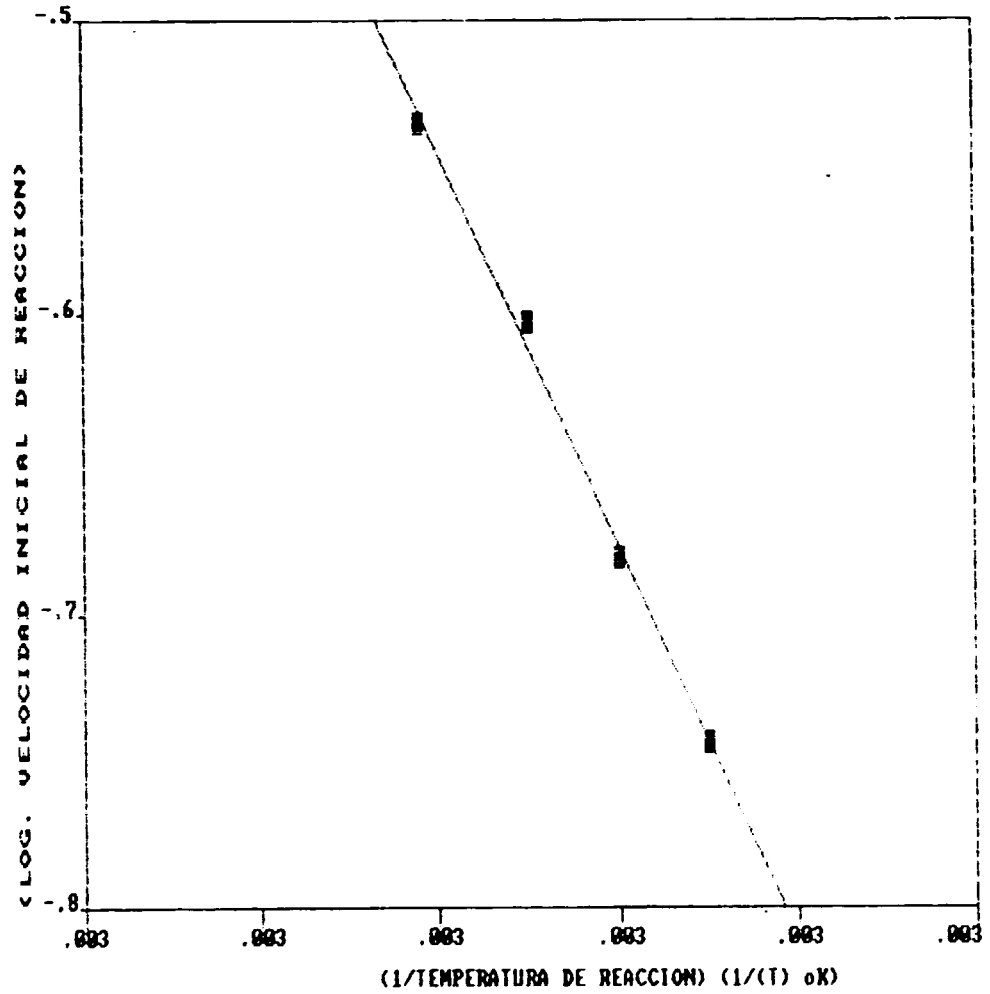


THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$(3.939E+00) + (-1.367E+03) * x$$

THE VARIANCE = 2.882E-05

FIG. No.6-.ENERGIA DE ACTIVACION DEL LACTOZYM



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$(3.698E+00) + (-1.306E+03)*X$$

THE VARIANCE - 2.767E-05

repetidamente se presentaba durante los ensayos efectuados. Cuando en cambio, se lleva a cabo la reacción a 50 °C, la enzima se desactiva al cabo de 5 horas de incubación.

Similar comportamiento se obtuvo para la enzima comercial.

2.6.4-EFEECTO DEL pH DE REACCION SOBRE LA EXPRESION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE B-GALACTOSIDA

El pH óptimo del extracto enzimático es cercano a pH=7 (Fig. 9, Tabla No. 9), mientras que el del Lactozym cubre el rango entre pH=7 y pH=8 (Fig. No. 10, Tabla No. 10).

2.6.5-ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DE B-GALACTOSIDASA CON RESPECTO AL pH

La Figura No. 11 (Tabla No. 11) 12), indica que el pH óptimo para el almacenamiento de la preparación enzimática cruda, es de pH=7.0, ya que en ese valor mantiene su máxima actividad catalítica, durante el periodo estudiado. Este resultado es de vital importancia, si se considera la comercialización de la preparación en presencia de aditivos químicos.

La Fig. No. 12 (Tabla No. 12), muestra que la preparación comercial, es más susceptible a cambios de pH, tanto hacia el lado alcalino, como el ácido.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN ONZAS DE BIC

ESTABILIDAD DEL EXTRACTO A DIFERENTES TEMPERATURAS

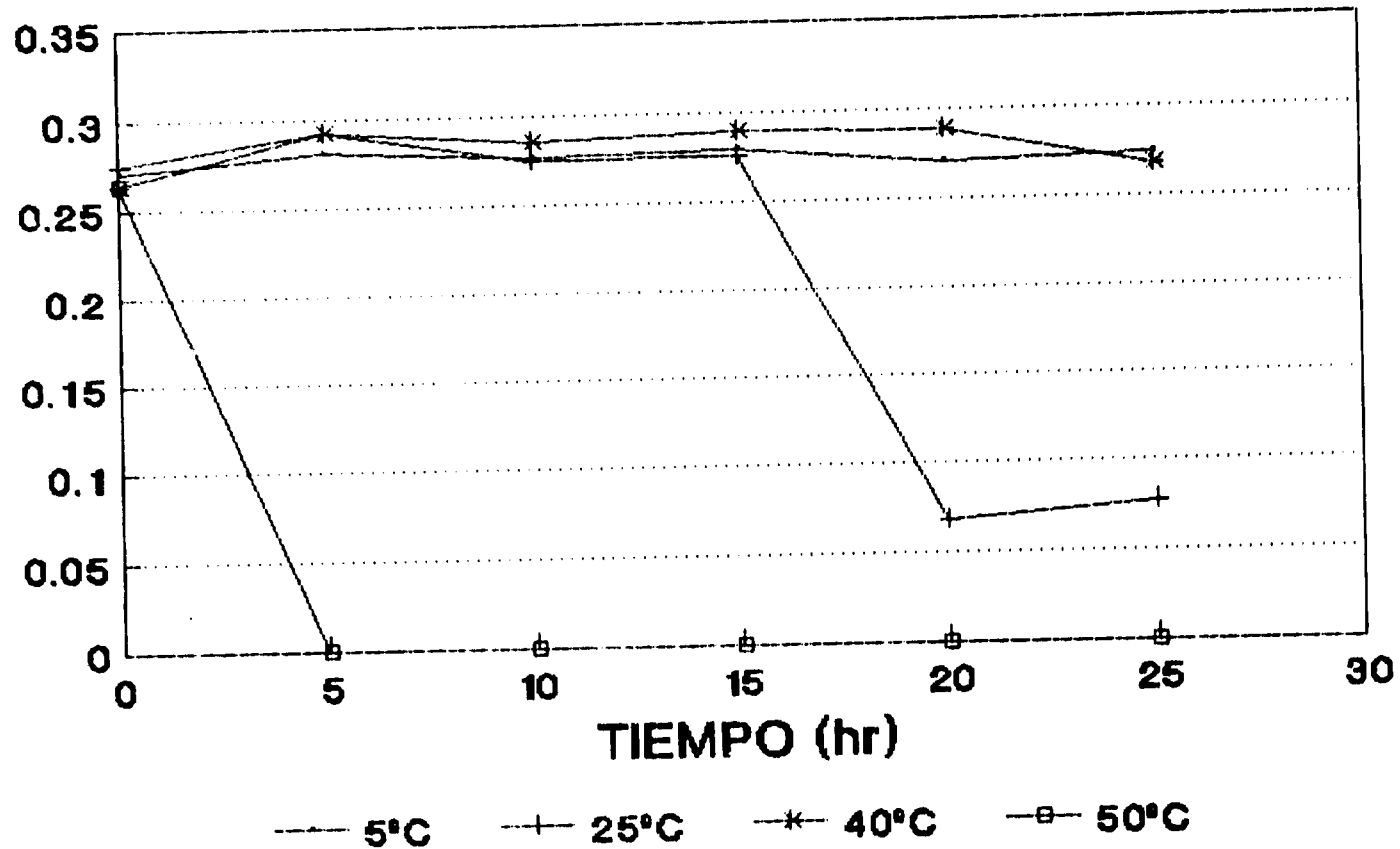


FIGURA No 7

ESTABILIDAD DE LACTOZYM A DIFERENTES TEMPERATURAS

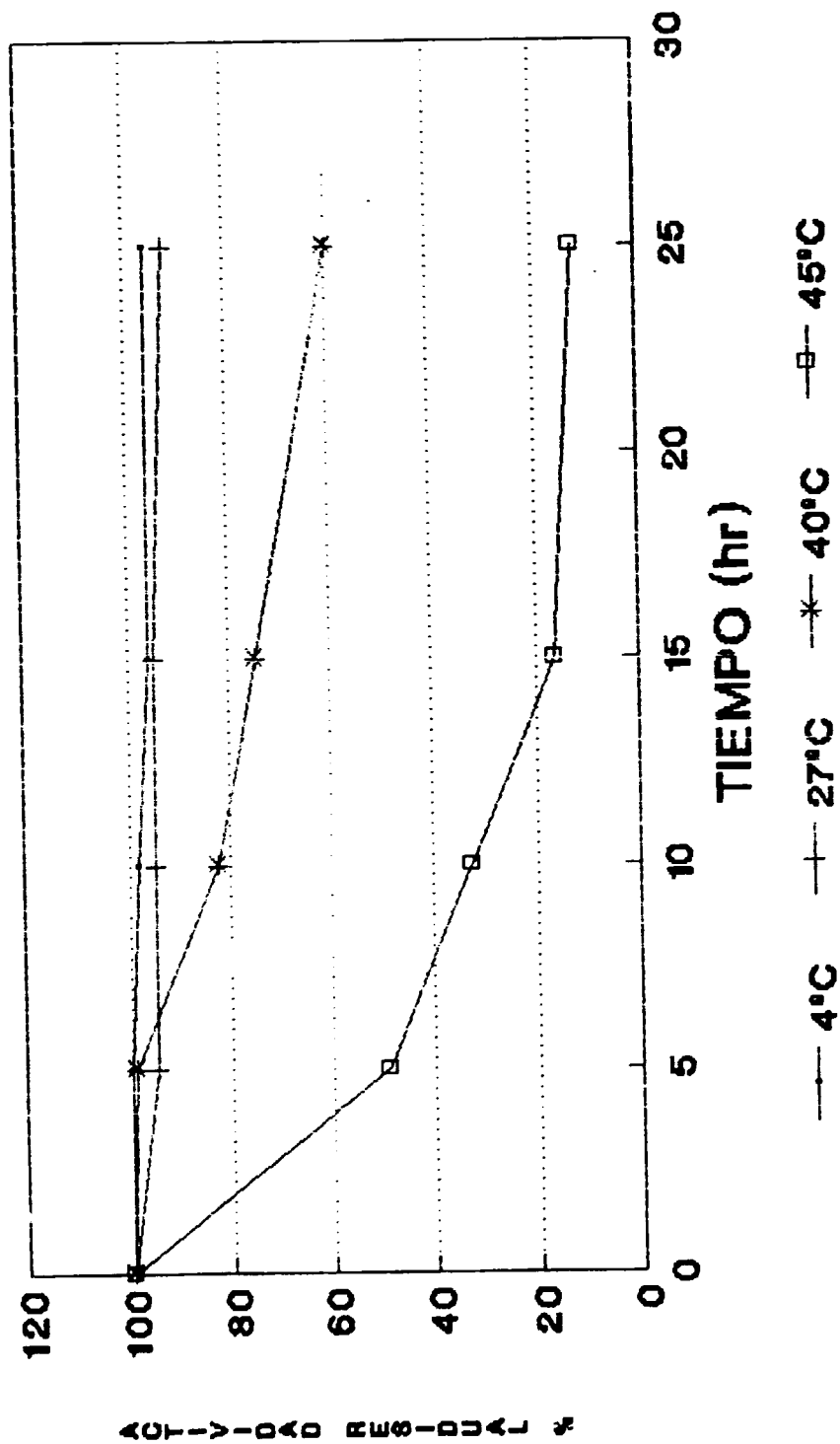


FIGURA No 8

FIG. No. 9-.pH OPTIMO DEL EXTRACTO

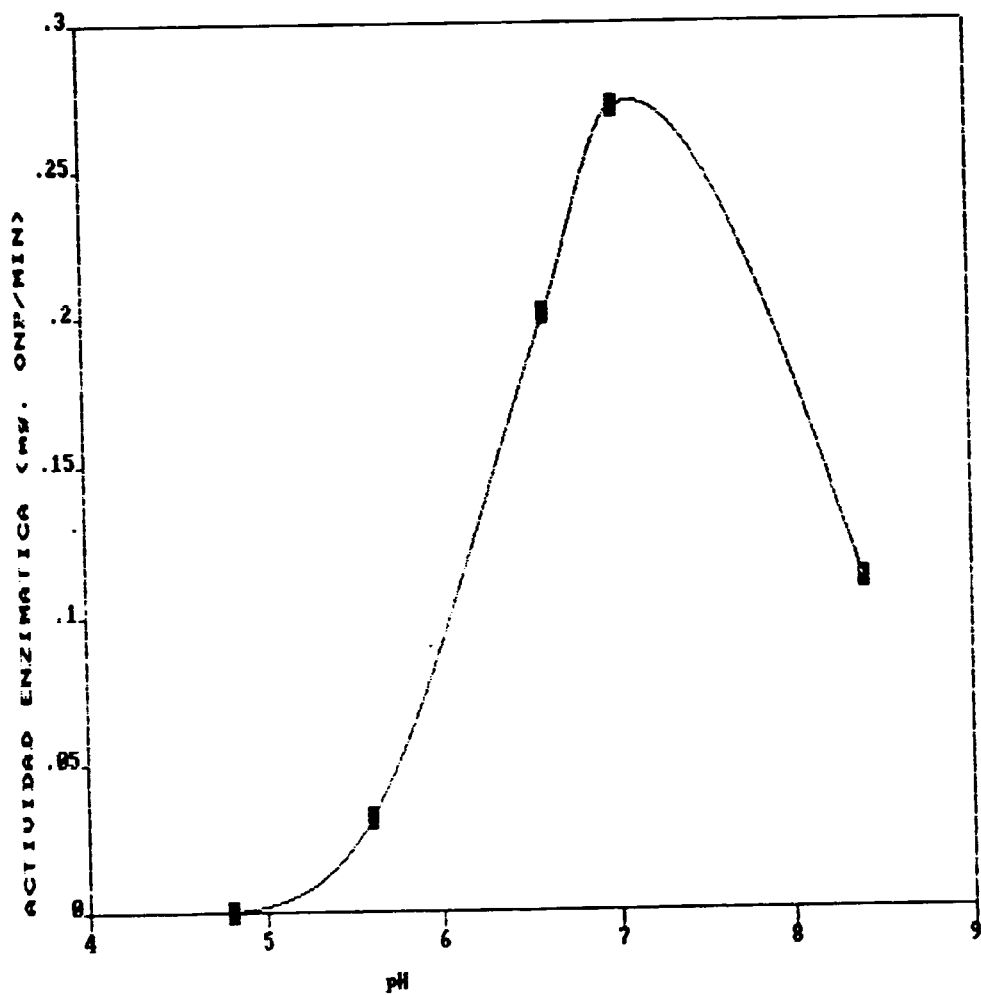
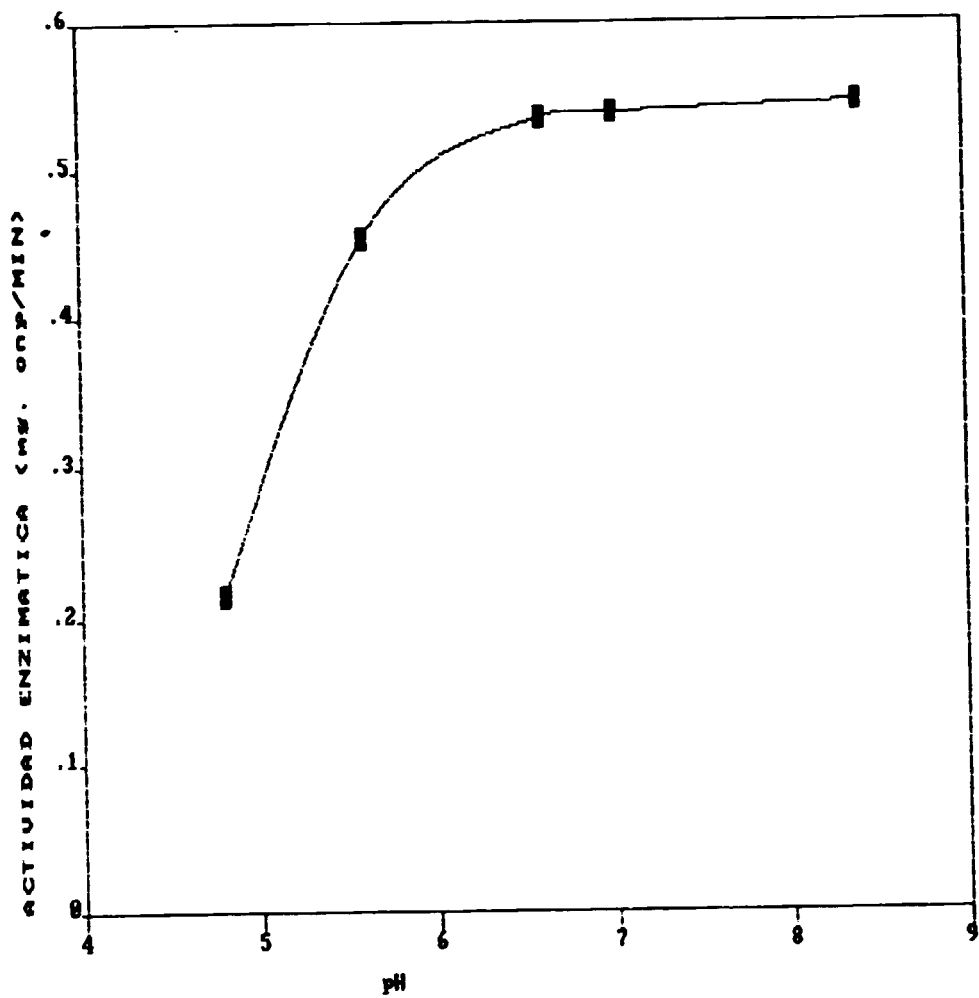


FIG. No. 18.-PH OPTIMO DEL LACTOZYM



ESTABILIDAD DEL EXTRACTO A DIFERENTES pH

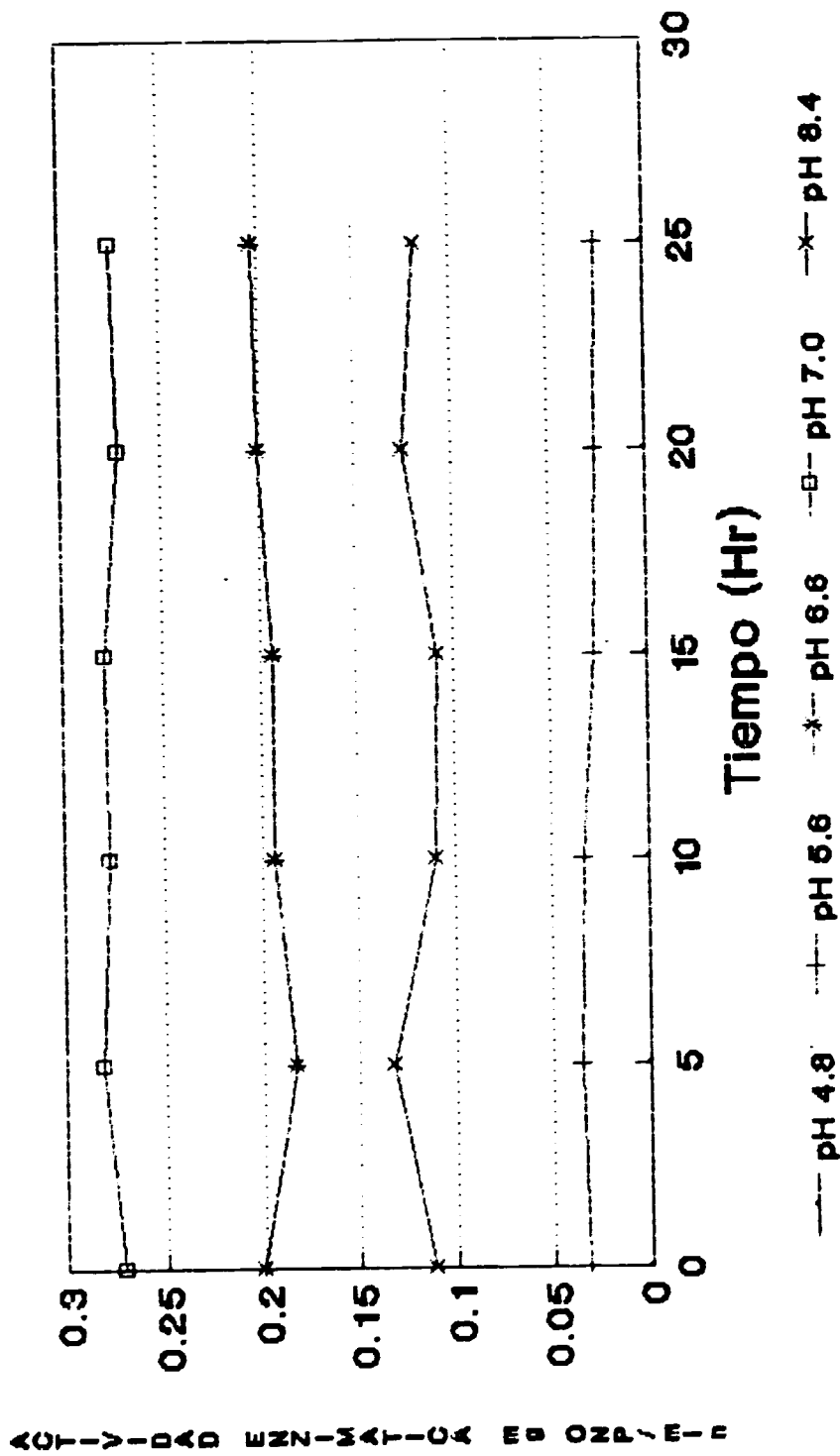


FIGURA No 11

ESTABILIDAD DEL LACTOZYM A DIFERENTES pH

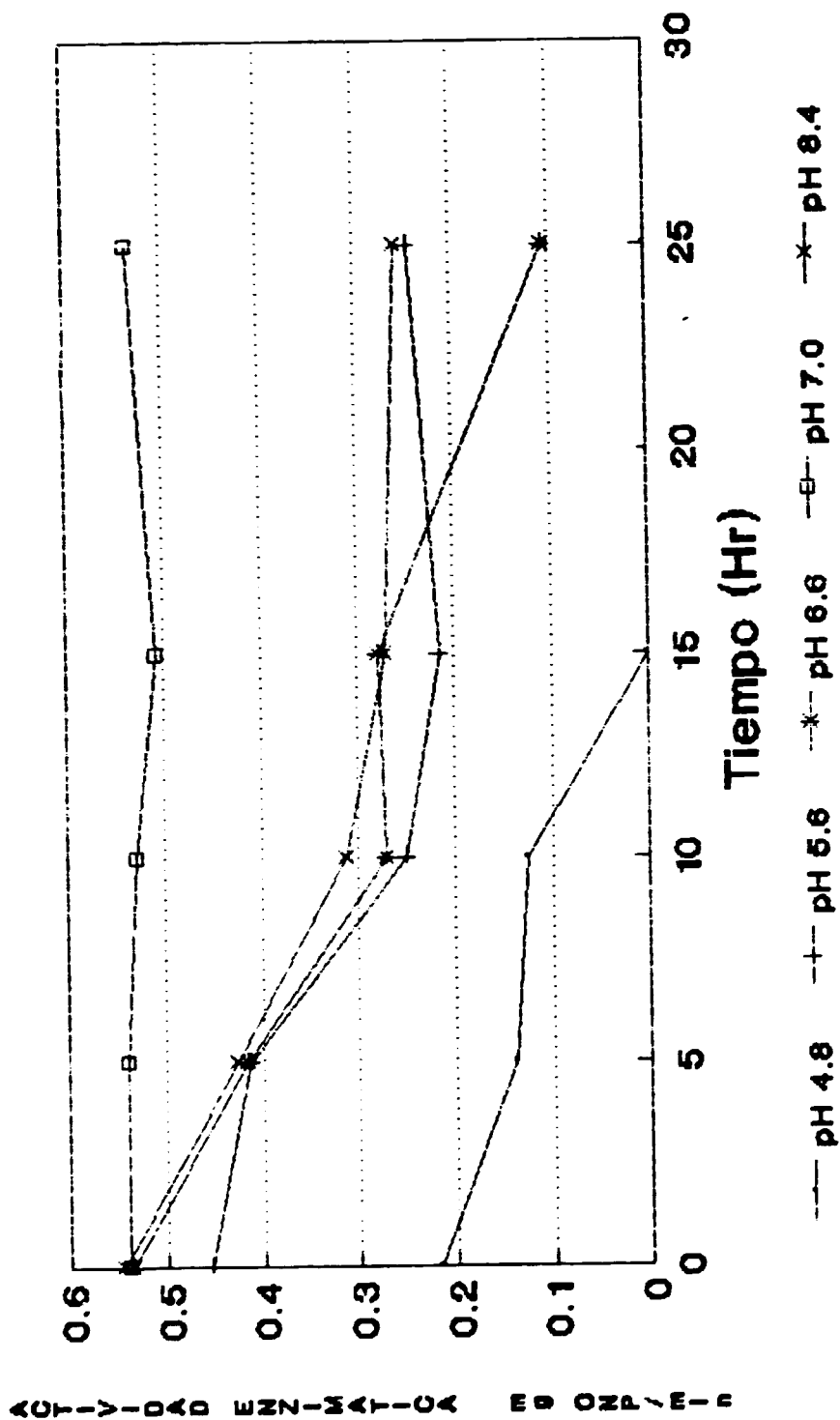


FIGURA No 12

2.7-CONCLUSIONES

- El extracto enzimático tiene un $K_m = 3,1$ mM ONPG y una $V_{max} = 0,83$ μ mol ONP/min. La enzima comercial en cambio posee, un $K_m = 3,29$ mM ONPG y una $V_{max} = 1.92$ μ mol ONP/min.
- La enzima cruda obtenida de *K. fragilis* tiene, una temperatura óptima de 45 $^{\circ}$ C; valor muy cercano al de la enzima comercial (47,5 $^{\circ}$ C).
- Las energía de activación de ambas enzimas son también muy similares (6.255,48 cal/mol para la enzima cruda y 6.067,86 para la enzima comercial).
- La desactivación térmica producida como resultado de prolongados periodos de incubación a temperaturas comprendidas entre (-5 $^{\circ}$ C) y 40 $^{\circ}$ C, responde a cinéticas similares; manteniendo su actividad catalítica a temperaturas cercanas a la temperatura óptima.
- La estabilidad del extracto enzimático crudo, frente a cambios de pH, es ligeramente superior a la correspondiente propiedad de la enzima comercial.
- La enzima cruda, desde el punto de vista de sus características cinéticas y bioquímicas, se compara favorablemente con la enzima comercial.

TABLA No 1-.ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL EXTRACTO A DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE SUSTRATO.-

CONCENTRACION DE ONPG (M)	ACTIVIDAD ENZIMATICA ($\mu\text{mol ONP/ min}$)
5.66×10^{-4}	0.1269
8.47×10^{-4}	0.1771
1.13×10^{-3}	0.2133
1.41×10^{-3}	0.2450
1.69×10^{-3}	0.3073

$$K = 3.1 \text{ mM}$$

$$V_{\text{max}} = 0.83 \text{ } \overset{\text{m}}{\mu\text{mol ONP/ .min}}$$

TABLA No 2-.ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL LACTOZYM A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO.-

CONCENTRACION DE ONPG (M)	ACTIVIDAD ENZIMATICA ($\mu\text{mol ONP/ min}$)
5.60×10^{-4}	0.2728
8.50×10^{-4}	0.4022
1.13×10^{-3}	0.5277
1.70×10^{-3}	0.6170
2.26×10^{-3}	0.7560

$$K_m = 3.29 \text{ mM}$$

$$V_{\text{max}} = 1.92 \mu\text{mol ONP/ min}$$

TABLA No 3-.TEMPERATURA OPTIMA DEL EXTRACTO ENZIMATICO

TEMPERATURA (°C)	ACTIVIDAD ENZIMATICA (μ mol. ONP/min.)	%
22	0.2071	46
33.5	0.3063	68
37	0.3398	76
40	0.3703	83
45	0.4476	100
50	0.4087	91
55	0.0453	10

TABLA No. 4-.TEMPERATURA OPTIMA DEL LACTOZYM

TEMPERATURA (°C)	ACTIVIDAD ENZIMATICA (mg ONP/MIN)
4	0.0752
25	0.1805
30	0.2083
35	0.2500
40	0.2916
45	0.3125
50	0.0940
55	0.0000

TABLA No. 5-.ENERGIA DE ACTIVACION DEL EXTRACTO

TEMPERATURA (T)	(1/T)	VELOCIDAD INICIAL (Vo)	Log Vo
(°K)	(1/°K)	(mg ONP/min)	
295.8	3.38×10^{-3}	0.2074	-0.683
306.74	3.26×10^{-3}	0.3069	-0.513
310.55	3.22×10^{-3}	0.3404	-0.468
313.47	3.19×10^{-3}	0.3706	-0.431
318.47	3.14×10^{-3}	0.4476	-0.3491

TABLA No. 6-.ENERGIA DE ACTIVACION DEL LACTOZYM

TEMPERATURA (T)	(1/T)	VELOCIDAD INICIAL (Vo)	Log Vo
(°K)	(1/°K)	(mg ONP/min)	
298.5	3.35×10^{-3}	0.1805	-0.743
303.03	3.30×10^{-3}	0.2080	-0.681
307.69	3.25×10^{-3}	0.2500	-0.602
313.47	3.19×10^{-3}	0.2910	-0.535

TABLA No 7-.ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DEL EXTRACTO A DIFERENTES TEMPERATURAS.

% ACTIVIDAD ENZIMATICA RESIDUAL						
TEMPERATURA	TIEMPO (Hr.)					
(°C)	0	5	10	15	20	25
5	100,00	100,00	98,58	99.29	96.44	97.51
25	100.00	100,00	100,00	100.00	24.73	28.00
40	100.00	99.32	96.94	98.64	98.30	91.16
50	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

TABLA No 8-.ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DEL LACTOZYM
A DIFERENTES TEMPERATURAS.

=====					
% ACTIVIDAD ENZIMATICA RESIDUAL					

TEMPERATURA	TIEMPO (Hr.)				
(°C)	0	5	10	15	25

4	100,00	100,00	98,26	95.72	95.72
27	100.00	94.77	94.77	94.77	92.12
40	100.00	99.12	82.35	74.50	60.01
45	100.00	49.02	32.68	16.33	12.10
=====					

TABLA No. 9-.pH OPTIMO DEL EXTRACTO

pH	ACTIVIDAD ENZIMATICA TOTAL ($\mu\text{mol ONP}/\text{min.}$)	%
4.8	0.000	0
5.6	0.032	11.8
6.6	0.201	74.1
7.0	0.271	100.0
8.4	0.111	40.9

TABLA No. 10-.pH OPTIMO DEL LACTOZYM

pH	ACTIVIDAD ENZIMATICA TOTAL ($\mu\text{mol ONP}/\text{min.}$)	%
4.8	0.2159	39.61
5.6	0.4541	83.31
6.6	0.5354	98.22
7.0	0.5381	98.71
8.4	0.5451	100.00

TABLA No 11-. ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DEL EXTRACTO BAJO
 DIFERENTES VALORES DE pH.

ACTIVIDAD ENZIMATICA ($\mu\text{mol ONP/min}$).						
pH	TIEMPO (Hr.)					
	0	5	10	15	20	25
4.8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5.6	0.032	0.035	0.033	0.027	0.026	0.025
6.6	0.201	0.183	0.194	0.194	0.201	0.203
7.0	0.271	0.281	0.277	0.279	0.271	0.274
8.4	0.111	0.132	0.110	0.108	0.125	0.118

TABLA No 12-.ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DEL LACTOZYM
A DIFERENTES pH.

=====					
% ACTIVIDAD ENZIMATICA RESIDUAL					
=====					
pH	TIEMPO (Hr.)				
	0	5	10	15	25
4.8	100,00	64.28	57.89	0.00	0.00
5.6	100.00	90.97	44.04	47.06	53.66
6.6	100.00	77.54	50.57	51.86	19.57
7.0	100.00	100.00	98.06	94.16	99.79
8.4	100.00	78.33	57.32	49.67	47.12
=====					