



CASA ABIERTA AL TIEMPO

UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA

IZTAPALAPA
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y FUNCIONAL DE UNA
 β -GLICOSIDASA HIPERTERMOFILICA

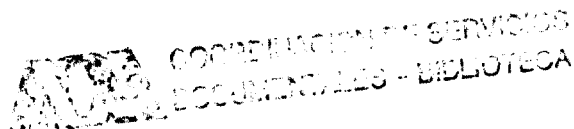
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

CRISTINA CRUZ HERNANDEZ



MEXICO, D. F.

ABRIL DE 1999

[Handwritten signature]
Coordinador de la Maestría
en Biotecnología

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad autónoma Metropolitana

222248

A mis profesores

A mis amigos

A mis Asesores (M en C. Mariano García, M en C. Lorena Gómez)

A la M en Biotec. Alma Cruz, por su asesoría y ayuda en la realización de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de la Sexta Generación de la Maestría en Biotecnología, por su apoyo incondicional y ayuda prestada en los momentos requeridos.

A todas las personas de la planta piloto 2 que conocí durante la realización de este trabajo, ya que de alguna forma (o de muchas formas) contribuyeron incondicionalmente a la realización de este trabajo, aun sin estar involucradas directamente.

Muy especialmente a la D.F.B Rosa Ma. Cruz y al Dr. Faustino Mijangos por su tiempo, ayuda y confianza depositada en la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres por ser parte importante de esto, y por seguir siendo el ejemplo de cariño y honradez a seguir.

A mis hermanos y hermanas, amigos de toda la vida, por su confianza, apoyo y cariño incondicional

A mis amigos de la U.A.M. Izlapalapa por brindarme su ayuda, compañía y apoyo en todo momento.

Muy especialmente a los investigadores que creen que los alumnos son una parte importante dentro de la investigación.

INDICE

| | Pag. |
|--|-------------|
| RESUMEN | v |
| INTRODUCCION | vi |
| OBJETIVO | viii |
| CAPITULOS | |
| 1. Importancia de la galactosidasa en la digestión | 1 |
| 2. β -Galactosidasa .. | 6 |
| 2.1 Fuentes | 7 |
| 2.2 Características de la β -Galactosidasa | 13 |
| 2.3 Usos industriales | 20 |
| 3. Microorganismos Extremófilos | 27 |
| 3.1 Extremozimas | 30 |
| 3.2 β -Glicosidasas de extremófilos | 33 |
| 3.2.1 CloneZyme Gly-001-02 | 35 |
| 4. Materiales y Procedimientos | 36 |
| 4.1 Determinación de actividad de la β -glicosidasa | 36 |
| 4.2 Determinación de proteína | 37 |
| 4.3 Análisis electroforético de la β -glicosidasa de estudio | 38 |
| 4.4 Determinación de Km y Vmax | 41 |
| 4.5 Determinación de pH óptimo | 42 |
| 4.6 Determinación de la energía de activación de la β -glicosidasa | 42 |
| 4.7 Calorimetría diferencial de barrido | 42 |
| 4.8 Determinación del efecto de los grupos sulfhidrilo sobre la actividad enzimática | 44 |
| 4.9 Influencia de cationes en la actividad enzimática | 44 |
| 4.10 Inhibición por productos de reacción | 45 |
| 4.11 Formación de oligosacáridos | 45 |
| 4.12 Aplicación en leche | 47 |
| 5. Resultados y Discusión | |
| 5.1 Determinación de actividad | 48 |
| 5.2 Determinación de pureza | 48 |
| 5.3 Determinación de peso molecular | 51 |
| 5.4 Determinación de Km y Vmax. | 54 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 5.5 | pH óptimo | 55 |
| 5.6 | Determinación de la energía de activación de la β-glicosidasa | 56 |
| 5.7 | Calorimetría diferencial de barrido | 58 |
| 5.8 | Determinación del efecto de los grupos sulfhidriilo sobre la actividad enzimática | 62 |
| 5.9 | Efecto de cationes en la actividad enzimática | 64 |
| 5.10 | Inhibición por productos de reacción | 65 |
| 5.11 | Formación de oligosacáridos | 66 |
| 5.12 | Aplicación en leche | 69 |
| 6. | Conclusiones | 71 |
| 6.1 | Recomendaciones | 72 |
| 7. | Bibliografía | 73 |

LISTA DE TABLAS

| | | PAGINA |
|-------------------|---|--------|
| CAPITULO 2 | TABLA | |
| Tabla 1 | Lactasas comerciales de levaduras | 9 |
| Tabla 2 | Características de lactasas comerciales | 10 |
| Tabla 3 | Valores de Km para diferentes lactasas | 13 |
| Tabla 4 | Peso molecular, T y pH óptimos, para diferentes lactasas | 15 |
| Tabla 5 | Compuestos inhibidores y activadores para diferentes lactasas | 17 |
| CAPITULO 3 | | |
| Tabla 6 | Géneros de hipertermófilos | 28 |
| Tabla 7 | Enzimas termoestables disponibles y sus aplicaciones | 32 |
| Tabla 8 | Glucosidasas y glucohidrolasa hipertermofílicas de <i>P. furiosus</i> | 33 |
| CAPITULO 4 | | |
| Tabla 9 | Patrón de referencia | 41 |
| Tabla 10 | Muestras para el análisis por calorimetría diferencial de barrido | 43 |
| Tabla 11 | Concentración de grupos sulfhidrilo agregados | 44 |
| CAPITULO 5 | | |
| Tabla 12 | Pesos moleculares (Daltones) | 52 |
| Tabla 13 | % Actividad retenida | 62 |
| Tabla 14 | Ecto de cationes en la actividad enzimática | 64 |
| Tabla 15 | Inhibición por productos de reacción | 65 |
| Tabla 16 | Hidrólisis de lactosa en leche | 69 |

LISTA DE FIGURAS

| | | PAGINA |
|-------------------|---|--------|
| CAPITULO 2 | FIGURA | |
| Figura 1 | Hidrólisis de la lactosa | 6 |
| Figura 2 | Mecanismo de la β -galactosidasa | 19 |
| CAPITULO 4 | | |
| Figura 3 | Diagrama de aplicación de muestras en placa de placa de cromatografía en capa fina | 47 |
| CAPITULO 5 | | |
| Figura 4 | Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante | 48 |
| Figura 5 | Detección de la β -galactosidasa en el gel de poliacrilamida no desnaturalizante a 37°C y 70°C | 49 |
| Figura 6 | Determinación de peso molecular en electroforesis desnaturalizante ... | 51 |
| Figura 7 | Detección de la β -galactosidasa en el gel de poliacrilamida desnaturalizante a 37°C y 70°C | 52 |
| Figura 8 | Representación de V_o de una reacción de Michaelis Menten, variación de la concentración de lactosa vs. V_o | 55 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 9 | Gráfica de Lineweaver-Burk de los datos mostrados en la figura 8, 1/[lactosa] vs. 1/Vo | 55 |
| Figura 10 | Efecto del pH sobre la Vo de la β -glicosidasa | 56 |
| Figura 11 | Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la β -glicosidasa | 57 |
| Figura 12 | Determinación de Energía de activación de la β -glicosidasa | 57 |
| Figura 13 | Termograma de β -glicosidasa de 30-300°C | 59 |
| Figura 14 | Termograma de β -galactosidasa de <i>E.coli</i> | 60 |
| Figura 15 | Termograma de β -glicosidasa 75°C/15 seg | 61 |
| Figura 16 | Termograma de β -glicosidasa 142°C/2 seg | 61 |
| Figura 17 | Grafica del efecto de grupos sulfhidrilo | 63 |
| Figura 18 | Hidrólisis de lactosa a diferentes tiempos de reacción | 68 |

RESUMEN

Se caracterizó bioquímica y funcionalmente una β -glicosidasa hipertermofílica capaz de hidrolizar la lactosa y se probó su utilidad en leche. La actividad específica de la β -glicosidasa fue de 1,965.33 UE/mg de proteína; una Unidad Enzimática (UE) de β -glicosidasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de glucosa por minuto a 90°C, pH 6.6. Los parámetros cinéticos K_M y V_{max} usando a la lactosa como sustrato a 90°C, fueron 234.41mM y 102.77 μ mol/mL·min, respectivamente. El pH óptimo fue 4.5. La energía de activación fue de 7,698.34 cal/mol. No se encontró influencia en la actividad enzimática por la incorporación de diferentes concentraciones de grupos sulfhidrilo como β -mercaptoetanol y cisteína (0-500 μ M de grupos sulfhidrilo). La actividad enzimática fue inhibida por los cationes Ca^{2+} y Na^+ , sin encontrar ninguna influencia en la adición de los iones K^+ y Mg^{2+} (5mM) y activada significativamente por Mn^{2+} (5mM). Se encontró que con galactosa 5, 10 y 15 mM, y con glucosa 10 y 15mM, la enzima se inhibe significativamente. La enzima formó oligosacáridos a medida que transcurrió el tiempo de reacción, mismos que empezaron a desaparecer al minuto 270 y que desaparecieron por completo al minuto 360. Se determinó el peso molecular de las tres subunidades que mostraron actividad de β -galactosidasa a 37 y 70°C (212,763 Da, 175,752 Da y 102,020 Da). Se encontró que la β -glicosidasa de estudio es pura, mientras que la β -galactosidasa de *E. coli* utilizada como referencia no es pura, esto mediante la determinación de actividad en geles de electroforesis no desnaturizante a 37 y 70 °C. Se comprobó una gran termorresistencia de la enzima ya que conserva su actividad después de someter a la enzima a tratamientos térmicos similares a la pasteurización y ultrapasteurización utilizando un calorímetro diferencial de barrido. Finalmente se comprobó la actividad enzimática de la β -glicosidasa en leche donde se encontró una mayor hidrólisis en ésta que en solución amortiguadora de fosfatos con lactosa al 5%. De acuerdo a los resultados obtenidos es factible utilizar la β -glicosidasa de estudio para la hidrólisis de la lactosa en leche adicionándole antes del tratamiento térmico ya que la enzima conserva su actividad después de éste, pudiéndose efectuar la hidrólisis en el empaque.

INTRODUCCION

El uso de enzimas en aplicaciones industriales es cada día más grande en la optimización de procesos, reduciendo tiempos de operación y costos en el proceso; sin embargo, en ocasiones las enzimas convencionales no son capaces de resistir condiciones extremas como pH, fuerza iónica, presión y temperatura, entre otras, por lo que el descubrimiento y/o desarrollo de enzimas estables a estas condiciones permitirá su aplicación en un mayor número de procesos.

La β -galactosidasa o lactasa es una enzima utilizada en la hidrólisis de la lactosa de la leche en galactosa y glucosa, principalmente con el objetivo de aumentar su digestibilidad. En la actualidad el proceso comercial para la elaboración de leche deslactosada utiliza β -galactosidasa de levadura (*Kluyveromyces lactis* o *Kluyveromyces marxianus*) la cual es poco termoestable, por lo que el proceso de hidrólisis implica hacer una incubación previa al proceso de pasteurización o ultrapasteurización lo que puede aumentar la carga microbiana de la leche, además de que el aumento de los grupos reductores por la hidrólisis puede ser causa de oscurecimiento durante el proceso térmico. Otra alternativa es la adición de la enzima esterilizada mediante técnicas de microfiltración para poder ser añadida a la leche después del proceso de pasteurización o ultrapasteurización sin el riesgo de contaminación y que la hidrólisis se lleve a cabo en el envase, lo que evita el oscurecimiento. Sin embargo, dado que el costo de las membranas es alto, estas técnicas elevan notablemente el costo del proceso.

Por lo anterior resultaría particularmente interesante el contar con una hidrolasa termorresistente, ya que presentaría un gran número de ventajas tales como un menor riesgo de contaminación microbiana al trabajar a temperaturas elevadas y principalmente por la posibilidad de contar con una enzima que pueda ser adicionada antes del tratamiento térmico y cuya actividad se conserve después de éste, de tal manera que la hidrólisis se dé en el envase.

El objetivo de este estudio es caracterizar bioquímica y funcionalmente una β -glicosidasa (Gly-001-02) con actividad sobre lactosa comercializada por la compañía

Recombinant BioCatalysis™ Inc. y que es producida a partir de genes aislados de microorganismos extremófilos. Esta enzima es capaz de tolerar 90°C durante 145 horas. En éste trabajo se planteó determinar sus parámetros bioquímicos y cinéticos, los cuales no han sido determinados antes para esta enzima, así como evaluar la actividad de ésta en leche con el objeto de proponerla como una alternativa termorresistente de las lactasas convencionales.

Cabe mencionar que, en la actualidad no existe reportado ningún trabajo en el que se utilice a nivel industrial una β -glicosidasa o una β -galactosidasa que resista altos tratamientos térmicos como pasteurización o ultrapasteurización de la leche para la hidrólisis de lactosa en la misma, para personas deficientes de lactasa.

2. OBJETIVO

Caracterizar bioquímica y funcionalmente una β -glicosidasa (Gly-001-02) hipertermofílica, comercializada por la compañía Recombinant Biocatalysis™ Inc. (producida a partir de genes aislados de microorganismos extremófilos) y evaluar la posibilidad de su aplicación en leche.

1. IMPORTANCIA DE LA β -GALACTOSIDASA EN LA DIGESTION

La leche humana, que es o debe ser el primer alimento en la vida extrauterina de nuestra especie, tiene varias funciones: la de la dieta, la de un complejo instrumento de protección -en parte inmunológica- de la cría y la de vehículo de estímulos sensoriales al parecer insustituibles. Como dieta, tiene la composición óptima que permite que la alimentación durante la lactancia este constituida por un solo alimento y que sólo de manera parcial puede ser imitada por sucedáneos industriales como alternativa durante los primeros meses de vida en aquellos casos en los que la lactancia materna esta contraindicada o realmente no se produce suficiente leche (Casanueva y Bourges, 1995). Además de su alto valor nutritivo, la leche es ampliamente utilizada como ingrediente en la elaboración de una gran cantidad y variedad de productos.

La lactosa (azúcar de la leche) es un disacárido formado por glucosa y galactosa. Como la lactancia termina de manera natural con el destete, la enzima intestinal que digiere la lactosa (lactasa o β -galactosidasa), casi siempre desaparece en forma también natural después de la infancia, de manera que todo mamífero adulto presenta una reducción en la capacidad de hidrólisis de lactosa, es decir no puede digerirla eficazmente y puede sufrir diarrea, flatulencia o algún otro malestar si la consume en cantidades que sobrepasen su capacidad de digestión, capacidad que difiere de una persona a otra (López y col. 1996; Dziezak, 1991; Casanueva y Bourges, 1995).

Las funciones fisiológicas del tracto gastrointestinal tienen como propósito incorporar los compuestos químicos indispensables para que el organismo ejerza su cometido metabólico, siendo la digestión, la secreción, la absorción y la motilidad, los mecanismos mediante los cuales el cuerpo humano alcanza este objetivo. En el intestino delgado se presentan todos estos procesos, y es aquí donde culmina el paso de los elementos y las sustancias químicas contenidas en los alimentos, hacia el medio interno (Vega, 1983).

La lactosa al llegar al intestino delgado es hidrolizada por la lactasa, que se encuentra en la madeja proteínica (Glicocaliz) de las microvellosidades de las células epiteliales del yeyuno, es así como la glucosa libre se encuentra en condición de ser transportada al interior de la célula, el paso de glucosa por la membrana se realiza contra un gradiente electroquímico, mediante un transportador que es compartido con el ión sodio. Una vez en el citoplasma, el sodio es "bombeado" fuera a través de la membrana lateral, interviniendo en ello cierto gasto de energía almacenada en el ATP. La galactosa es llevada al interior de las células mediante el mismo mecanismo de transporte activo de la glucosa (Vega, 1983). Una vez dentro, los componentes de la lactosa, pueden funcionar como fuentes de carbono orgánico y tienen el potencial de ser oxidados para generar ATP, por lo que a fin de proveer energía es necesario que la lactosa sea hidrolizada a sus componentes (Solomons, 1996).

Los monosacaridos glucosa y galactosa, cumplen en el organismo funciones tanto energéticas como estructurales. Sin lugar a dudas, su aporte energético es la característica que más llama la atención desde el punto de vista nutricional (Casanueva y Bourges, 1995).

La lactosa, es el único carbohidrato presente en la leche, se sintetiza en las células de las glándulas mamarias, y no existe en ninguna otra fuente natural (Nijpels, 1981). La cantidad de lactosa difiere en la leche de distintas especies siendo la humana la que tiene una mayor concentración con respecto a otros mamíferos (6.5% aproximadamente) (López y col., 1996; Pérez-Gavilán y Pérez-Gavilán, 1984).

Existen estudios donde se reporta que la lactosa además de su papel como fuente de energía para lactantes, también tiene una importante función en la absorción de calcio, fósforo y aminoácidos a través del intestino (Fennema, 1985).

Una baja actividad de lactasa en el intestino, provoca una hidrólisis deficiente de la lactosa y probables problemas en su digestión, ya que cuando la lactosa de la dieta llega al yeyuno, si la lactasa no se encuentra en cantidad suficiente para hidrolizarla, la lactosa no digerida provoca una sobrecarga osmótica en el intestino que puede traer como consecuencia una expansión del volumen de líquido intraluminal e incremento en los movimientos peristálticos causando diarrea. Al llegar la lactosa al colon, la flora bacteriana la fermenta produciendo una serie de gases como hidrógeno, metano y bióxido de

carbono, la formación de éstos provoca flatulencia; además hay formación de ácidos orgánicos que causan irritación en el intestino (Palma y col., 1996; Solomons, 1996).

DEFICIENCIA DE LACTASA. Aunque muchos autores prefieren no usar el término de deficiencia de lactasa ya que de alguna forma, sugiere que lo normal es la existencia de actividad lactasa intestinal durante toda la vida, es pertinente la utilización de éste para enfatizar que en la deficiencia de lactasa están involucradas dos galactosidasas, la lactasa y la florizin-hidrolasa, ambas tienen la misma acción hidrolítica sobre la unión beta entre los monosacáridos de la lactosa. De esta manera, el término deficiencia implica que la actividad enzimática ejercida por ambas enzimas, no es suficiente para hidrolizar la lactosa presente en el intestino (Lisker, 1996; Vega, 1996).

La deficiencia primaria de lactasa se asocia a un mecanismo de transmisión genética. Existen varias líneas de investigación que sugieren que la disminución en la actividad de la lactasa intestinal, que ocurre durante la niñez y la juventud, es un fenómeno de naturaleza hereditaria. Es un fenómeno gradual que sólo en algunos casos produce intolerancia a la lactosa (Vega, 1996; Rosado, 1996a; Lisker, 1996).

La deficiencia secundaria de lactasa, es la condición adquirida en situaciones como: lesión o desbalance metabólico, diarrea aguda, cirugía de la mucosa intestinal o del intestino delgado, parasitosis, nacimiento prematuro, desnutrición y la enfermedad inflamatoria del tracto digestivo, las cuales producen una capacidad reducida de hidrólisis de lactosa y disminuyen de manera importante la posibilidad de consumir leche o productos con lactosa, para estos individuos es recomendable la sustitución de la leche por fórmulas con lactosa hidrolizada o el uso de fórmulas no lácteas (Rosado, 1996a y b; Rosado y Lisker, 1996; Rosado y Mimiaga, 1996; Solomons, 1996).

En general, la deficiencia secundaria disminuye drásticamente la actividad de la lactasa y produce una disminución en la capacidad de digestión de lactosa y de tolerancia del individuo que la padece (Rosado, 1996a).

Una consecuencia lógica de la deficiencia de lactasa ya sea primaria o secundaria, es que disminuye la capacidad del individuo de digerir y en la mayoría de los casos (más no en todos) de tolerar la lactosa (Rosado, 1996).

INTOLERANCIA A LA LACTOSA: Alude a la condición en la que están presentes manifestaciones clínicas gastrointestinales (como flatulencia, distensión abdominal y dolor de tipo cólico, entre otras) relacionadas con este azúcar debido a una hidrólisis deficiente de una dosis oral de lactosa.

Más de las dos terceras partes de la población mundial adulta muestran intolerancia a la lactosa (Vega, 1996; Dziezak, 1991; Whitaker, 1994, Holsiger y Kligerman, 1991). En niños mexicanos la deficiencia de lactasa y la intolerancia a la lactosa no se presentan en general antes de los cuatro años de edad. En el caso de individuos que presentan intolerancia a la lactosa, aun con dosis pequeñas de leche, pueden consumir leche con la lactosa hidrolizada o productos como yogurt del que se sabe que produce autodigestión de lactosa de acuerdo al contenido de lactobacilos (Rosado y Lisker, 1996).

MALA DIGESTION DE LACTOSA: Puede definirse como la hidrólisis deficiente de una dosis oral de lactosa, dejando cantidades residuales de azúcar que pasan del intestino delgado al grueso, sin causar con esto algún padecimiento gastrointestinal (Solomons, 1996).

Ya que tanto en la mala digestión como en la intolerancia se tiene una hidrólisis deficiente del disacárido, cabe resaltar que la diferencia existente entre la mala digestión de lactosa y la intolerancia a la lactosa consiste en que en esta última se presentan síntomas y molestias gastrointestinales que aparecen después de la ingestión de leche tales como eructos, flatulencia, distensión abdominal, cólicos y borborigmos; síntomas y molestias que no se presentan en la mala digestión de lactosa aun cuando hay una hidrólisis deficiente de lactosa.

Debido a la gran importancia nutritiva de la leche y a los problemas asociados a la hidrólisis y digestión de lactosa por el organismo humano, desde hace varios años se inicio la exploración de diversas fuentes microbianas de la enzima lactasa (β -galactosidasa) que pudieran ser utilizadas para hidrolizar la lactosa en la leche o en otros productos lácteos. A partir de esta exploración, se han encontrado lactasas de diferentes fuentes, disponibles incluso para su uso a nivel industrial.

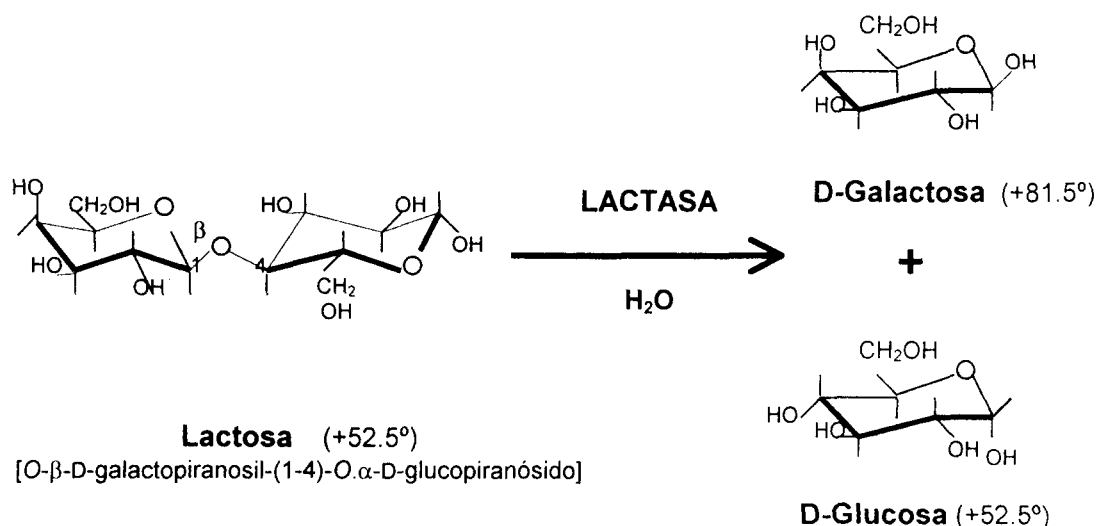
En la sección siguiente se describen las características principales de la enzima (β -galactosidasa o lactasa) mencionada.

2. β-GALACTOSIDASA

La β-galactosidasa (β-D-galactosido galactohidrolasa, EC 3.2.1.23), conocida comúnmente como lactasa, ha sido una de las glicosidasas más estudiadas (Whitaker, 1994; Champluvier y col. 1988; Chen y col., 1992).

Esta enzima cataliza la hidrólisis de β-D-galactosidos, siendo altamente específica por el enlace β en β-galactosidos (Castillo, 1990). De entre los sustratos naturales existentes, su acción en lactosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranososa), ha sido la más estudiada. En la hidrólisis del disacárido, mediante la inclusión de una molécula de agua, se rompe el enlace glicosídico β (1-4) que une a los dos monosacáridos, resultando así en los respectivos D-glucosa y D-galactosa como se muestra en la figura 1 (Whitaker, 1994; García-Garibay y Gómez Ruíz, 1996).

FIGURA 1. HIDROLISIS DE LA LACTOSA



(Whitaker, 1994)

El estudio completo de una enzima comprende la investigación de una serie de características, dicho estudio dependerá del tipo de enzima, de su origen y de la aplicación que se le desee dar a la enzima.

Respecto a la β -galactosidasa se dispone de varios métodos para medir la actividad enzimática, entre los cuales se encuentran el cambio en la rotación específica de $+52.5^\circ$ a $+67.0^\circ$, cuando la lactosa es hidrolizada (Figura 1). Otra manera es determinando la glucosa producida, mediante el sistema enzimático glucosa-oxidasa-peroxidasa. Posiblemente el método más común es el uso de un sustrato cromogénico, en el cual un producto de la hidrólisis es colorido. Pueden usarse sustratos como *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido o *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido dando como resultado los productos, *o*-nitrofenol o *p*-nitrofenol, que tienen una absorbancia máxima cercana a los 400nm (arriba de pH 7) (Whitaker, 1994).

2.1 FUENTES

Las β -galactosidasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son producidas por animales (en órganos como intestino, en tejidos cerebrales y piel), plantas (como almendra, alfalfa, granos de café, té, etc.) y microorganismos (bacterias, hongos y levaduras). De acuerdo a su fuente las propiedades varían enormemente (Cavaille y Combes, 1995; Gekas y López-Leyva, 1985). En la tabla 2 se enlistan las propiedades de lactasas comerciales.

Entre las β -galactosidasas producidas por bacterias se puede mencionar la β -galactosidasa de *Escherichia coli*, una de las más estudiadas y de la cual existe una gran cantidad de información científica acumulada debido a la utilización de ésta en estudios de regulación genética, sin embargo, dado que no puede ser utilizada en alimentos, no tiene interés comercial más allá de su uso como reactivo de laboratorio (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996).

En la búsqueda de más y mejores lactasas, principalmente en cuanto a termoestabilidad, la β -galactosidasa de la cepa autolítica *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*Str. thermophilus*) ha despertado un gran interés en los últimos años, pues se considera una opción promisoriosa por su actividad a temperaturas arriba de 50°C , tiene un pH óptimo de 7.1 y es estable al pH de la leche (6.6). Su temperatura óptima es de

55°C, desnaturalizándose rápidamente por arriba de ésta si la reacción se efectúa en solución amortiguadora, sin embargo, la estabilidad se incrementa notablemente (entre 37 y 83 veces) en un rango de 60-65°C cuando trabaja en leche, llegando a presentar una vida media de 146 minutos a 60°C. Además, se ha encontrado que el efecto inhibitorio de la galactosa es mínimo para esta enzima (Chang y Mahoney, 1989; García-Garibay y col., 1993).

Otra lactasa bacteriana con grandes ventajas es la proveniente de *Bacillus stearothermophilus*, de la cual se reporta ser termoestable, con una vida media de 7.5 horas a 60°C o 1.3 horas a 65°C, y además ser poco sensible a la inhibición por galactosa. El problema son los bajos rendimientos de producción comparados con los obtenidos con lactasas de levaduras (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996).

Otras bacterias con actividad lactásica estudiadas son *Bacillus macerans*, *Thermus aquaticus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus sporogenes* (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996).

Respecto a lactasas de hongos, además de las fuentes comerciales listadas en la tabla 2, se conocen, *Neurospora crassa*, *Aspergillus foetidus*, *A. flavus*, *A. phoenicis*, *Mucor pusillus*, *M. miehei*, *Scopuloriopsis* sp., *Alternaria palmi*, *A. alternara*, *Curvularia inaequalis*, *Fusarium moniliforme* y *Paecilomyces varioti*. La lactasa de esta última presenta una temperatura óptima de actividad de 50°C, mantiene el 95% de actividad durante tres horas a 60°C y tiene un pH óptimo de 3.5. La lactasa de *Alternaria palmi* tiene una vida media de 40 min a 70°C (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996).

En cuanto a levaduras, cabe mencionar que las que utilizan lactosa son fuentes excelentes de lactasa, y la enzima se obtienen de varias de ellas (tabla 1), incluyendo *K. marxianus* (conocida anteriormente como *K. fragilis*, considerada una de las mejores fuentes de la enzima), *K. lactis* (conocida anteriormente como *Saccharomyces lactis*), *Candida pseudotropicalis*, *Saccharomyces anamensis*, *Torulopsis versatilis* y *T. sphaerica* (Castillo, 1990; Chen y col., 1992; De Bales y Castillo, 1979; Bonekamp y Oosterton, 1994). Otras especies de levadura que son fuentes potenciales de β -galactosidasa son:

Kluyveromyces bulgaricus, *Candida kefyi*, *Brettanomyces anomalus* y *Wingea roberstsi* (García-Garibay, 1992; García-Garibay y Gómez Ruíz, 1996).

Las lactasas purificadas de las levaduras *K. marxianus*, *K. lactis* y *Candida pseudotropicalis*, utilizadas para hidrolizar la lactosa en leche (Bonekamp y Oosterton, 1994; De Bales y Castillo, 1979) y de los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* utilizadas para hidrolizar la lactosa de suero, son las preparaciones comerciales más ampliamente usadas (Dziezak, 1991; Cavaille y Combes, 1995; Bonekamp y Oosterton, 1994; Holsinger y Kligerman, 1991).

El costo de las lactasas está en relación con su pureza, algunas preparaciones muy impuras generan sabores desagradables en la leche. También se ha reportado la presencia de proteasas contaminantes (o de otras enzimas), como en el caso de Lactozyme o Maxilact, las cuales pueden en algunos casos inducir coagulación de la leche (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996). En la Tabla 1 se enlistan las lactasas comerciales de levadura disponibles en todo el mundo.

TABLA 1. LACTASAS COMERCIALES DE LEVADURA

| Nombre comercial | Compañía | Fuente | Unidades (kcat/mL) |
|-------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------|
| Maxilact LX-500 | Gist-Brocades | <i>K lactis</i> | 5000 |
| Maxilact L-2000 | Gist-Brocades | <i>K lactis</i> | 2000 |
| Kerulac | Gist-Brocades | <i>K lactis</i> | --- |
| Hydrolat | Sturge Enzymes | <i>K fragilis</i> | 5000 |
| LP 7028 | Rhom | <i>K fragilis</i> | 2000 |
| Lactozym | Novo | <i>K fragilis</i> | 3000 |
| Neutral Lactase | Pfizer | <i>C. pseudotropicalis</i> | 2750 |
| Takamine lactase | Miles | <i>K fragilis</i> | --- |
| Lact-Aid | Lact-Aid | <i>K lactis</i> | 1000 |

(García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996)

Las levaduras mencionadas son microorganismos inocuos, cuya utilización en alimentos, incluso de la biomasa entera, está reglamentado y permitido por las legislaciones de la mayoría de los países desarrollados; particularmente *K. marxianus* tiene categoría GRAS (Generally Recognized As Safe) por la Food and Drug Administration de los EUA (García-Garibay, 1992).

Existen diversos estudios de lactasas inmovilizadas de hongos, levaduras y bacterias, ya que por medio de la inmovilización de enzimas se pueden reutilizar y así disminuir costos en procesos de producción. En la Tabla 2 se muestran las características de las lactasas comercialmente disponibles (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996).

TABLA 2. CARACTERISTICAS DE LACTASAS COMERCIALES

| Origen | pH óptimo | Temperatura óptima |
|-----------------------------------|------------------|---------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | 3.0-4.0 | 55-60°C |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | 5.0 | 50-55°C |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | 6.5-7.3 | 35°C |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 6.6. | 37°C |
| <i>Candida kefir</i> | 6.2 | 45-47°C |
| <i>Escherichia coli</i> | 7.0 | 37°C |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 7.1 | 55°C |

(García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996)

Dado que el objetivo de este estudio es evaluar la actividad sobre lactosa de una β -glicosidasa (Gly-001-02) en leche, con el objeto de proponerla como una alternativa termoresistente de las lactasas convencionales, en los siguientes párrafos se hablará más específicamente de la lactasa de levadura debido a que ésta es la utilizada en la hidrólisis de lactosa en leche, como ya se mencionó en los párrafos anteriores.

Obtención de la β -Galactosidasa

Producción de la enzima de levadura

La β -galactosidasa de levadura es una enzima intracelular inducible. Comercialmente se produce a partir de suero de leche (sustrato industrial con cantidad considerable de lactosa), suplementado con nitrógeno inorgánico $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ y algunos otros nutrientes (como extracto de levadura o licor de remojo de maíz, fósforo, fuentes de vitaminas, etc.) (García-Garibay, 1992; Castillo, 1990).

Las condiciones de crecimiento en suero varían enormemente para cada levadura. Con *K. fragilis* y *C. pseudotropicalis*, a pH de 3 o menor parece producir los mayores rendimientos de lactasa. Con *K. fragilis*, se obtuvo un mejor rendimiento de biomasa entre

35 y 40°C, pero a 20°C fue mejor la producción enzimática (Castillo, 1990). Se encontró una máxima producción de lactasa por *Candida pseudotropicalis* y *Kluyveromyces fragilis* crecidas en soluciones deproteinizadas de suero al 2%, suplementado con extracto de levadura, (NH₄)₂SO₄ y KH₂PO₄ a 30°C y 20°C respectivamente, ambas a pH 3 (De Bales y Castillo, 1979; Sánchez, y Castillo, 1980).

Extracción y purificación de β -galactosidasas de levadura

Existen dos opciones en la obtención de un producto enzimático de β -galactosidasa de levadura: una es la ruptura de las células para extraer y purificar la enzima, y la otra es efectuar una ruptura parcial de la pared celular (conocida como permeabilización) de modo que la enzima no sea secretada al espacio extracelular y la lactosa y sus productos de hidrólisis puedan difundir libremente a través de la pared y membrana celulares, sin que medie un transporte activo, en este método se utilizan las células completas como preparado crudo de la enzima. Se han reportado diferentes métodos en la permeabilización de células de *Kluyveromyces* entre los cuales se encuentran la utilización de solventes (como tolueno, cloroformo, acetona, etanol, butanol, polibreno, n-propanol, isopropanol, terbutanol, y dimetilsulfoxido), la utilización de detergentes (como triton X-100, quitosan), el secado por aspersion y ruptura mecánica con homogenizador (García-Garibay, 1992; Casas y col., 1992, Champluvier y col., 1988).

Mediante la primera opción de extracción, se obtiene un producto más puro, con menos probabilidades de que subsistan enzimas contaminantes como proteolíticas o la actividad conocida como zimasa, que es la capacidad de utilizar los azúcares como sustrato para la producción de etanol y bioxido de carbono por la vía glucolítica. Con la segunda opción se obtienen productos de menor actividad enzimática y con mayor riesgo de contener actividad de zimasa residual y de otras enzimas, lo que puede conferir sabores extraños al producto lácteo donde sea utilizado (García-Garibay, 1992).

Purificación de la enzima. Se lleva a cabo cuando se desea obtener un producto más puro y de mayor actividad enzimática para lo cual es necesario eliminar del extracto celular los componentes biológicos "contaminantes". Tres métodos de purificación en gran

escala que son muy conocidos, son los siguientes: precipitación con sales, precipitación con solventes y ultrafiltración (García-Garibay, 1992).

Mediante la precipitación con sales se pueden lograr precipitaciones fraccionadas; es una técnica ampliamente empleada para la concentración y purificación de enzimas comerciales. De entre las sales utilizables el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es la más usada debido a su alta fuerza iónica, aunque se prefiere muchas veces Na_2SO_4 ya que esta no disminuye el pH de la solución, ni es corrosiva. La enzima puede ser resuspendida por ejemplo en una mezcla de agua y glicerol (este último confiere estabilidad a la β -galactosidasa de levadura) adicionada con iones que confieren estabilidad y activan a la enzima (García-Garibay, 1992). La aplicación de este método se encuentra también reportada para β -galactosidasas de hojas de té (Halder y Bhaduri, 1997) y de *Bacillus circulans* (Mozaffar y col., 1984).

Mediante la precipitación con solventes, al igual que con sales, se pueden lograr precipitaciones fraccionadas. Ejemplos de la utilización de esta técnica se encuentran reportados para las lactasas de *Str. thermophilus* (Chang y Mahoney, 1989), *Candida pseudotropicalis*. (De Bales y Castillo, 1979), *Mucor pusillus* (Ismail y col., 1997), *Paecilomyces varioty* (Kelly y col., 1988), *Kluyveromyces fragilis* (Mahoney y Whitaker, 1978; Sánchez y Castillo, 1980), llevando a cabo la precipitación con acetona, cloroformo, acetona, isopropanol y acetona o cloroformo respectivamente.

La ultrafiltración se podría proponer como un método de concentración de la β -galactosidasa (eliminación de agua), con la eliminación de algunos compuestos de bajo peso molecular para finalmente obtener un producto de alta actividad enzimática, esto es factible siempre y cuando no sea un producto con actividad zimasa u otra actividad enzimática contaminante, lo cual se ha logrado para la lactasa de *Str. thermophilus* (García-Garibay, 1992; Smart y Richardson, 1987).

2.2 CARACTERISTICAS DE LA β -GALACTOSIDASA

En este capítulo se hablará sólo de las β -galactosidasas que son utilizadas como lactasas. Para las diferentes fuentes de lactasas, se tienen las siguientes características reportadas en la literatura y que a continuación se mencionan.

El K_m (parámetro cinético cuyo valor denota la afinidad existente entre la enzima y el sustrato) (Voet y Voet, 1995) de las lactasas generalmente se encuentra alrededor de 3mM para ONPG y entre 10-30mM para lactosa (Castillo, 1990). En la tabla 3 se enlistan los K_m de lactasas provenientes de diferentes microorganismos.

TABLA 3. VALORES DE K_m PARA DIFERENTES LACTASAS

| FUENTE | SUSTRATO | K_m (mM) | REFERENCIA |
|---|------------------------------|------------------------|---------------------------|
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | ONPG, lactosa | 5, 40 | Brady y col., 1995 |
| <i>Candida pseudotropicalis</i> | ONPG, lactosa | 3, 33 | Castillo y col., 1983 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> (Maxilact LX-5000) | ONPG, lactosa | 1.7, 17.3 | Cavaille y Combes, 1995 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | ONPG | 4.2 | Champluvier, y col. 1988 |
| <i>Candida pseudotropicalis</i> | ONPG | 3.06 | De Bales y Castillo, 1979 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | ONPG, lactosa | 1.61, 16.8 | Dickson y col., 1979 |
| <i>Torulopsis versatilis</i> M6, <i>T. sphaerica</i> J28, <i>C. Pseudotropicalis</i> B57, A60 | ONPG | 3.45, 2.09, 3.45, 2.82 | Itoh y col., 1982 |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | ONPG | 3.94 | Ku y Hang, 1992 |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | ONPG, lactosa | 2.72, 13.9 | Mahoney y Whitaker, 1977 |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | ONPG | 2.5 | Sánchez y Castillo, 1980 |
| <i>Saccharomyces fragilis</i> | ONPG, lactosa | 2.5, 24 | Wendorff y Amudson, 1971 |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | Lactosa | 43.6 | Carrara y Rubiolo, 1996 |
| <i>Aspergillus niger</i> | Lactosa | 20-85 | Mahoney, 1985 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | Lactosa | 50 | Mahoney, 1985 |
| <i>E. coli</i> | ONPG / PNPG | 0.161 / 0.531 | Badui, 1990 |
| <i>E. coli</i> | α -lactosa | 1.90 | Badui, 1990 |
| <i>E. coli</i> | Lactosa | 12-17 | Mahoney, 1985 |
| <i>Bacillus sp</i> | ONPG | 13.5 | Choi y col 1995 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Lactosa | 700 | Mahoney, 1985 |
| <i>B. stearothermophilus</i> | Lactosa | 2 | Mahoney, 1985 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | Lactosa | 7 | Smart y Richardson, 1987 |
| <i>Thermus aquaticus</i> | ONPG | 2 | Ulrich y col., 1972 |
| <i>Thermus aquaticus</i> | ONPG, lactosa | 6.59, 60 | Berger y col, 1997 |
| <i>Thermotogata neapolitana</i> | PNPG | 0.50 | Duffaud y McCutchen, 1997 |
| <i>Sulfolobus solfataricus</i> | ONPG | 1.99 | Moracci y col., 1997 |
| <i>Pyrococcus furiosus</i> | PNPG | 0.15 | Kengen y col., 1993 |
| <i>Pyrococcus furiosus</i> | Gl ₆ p β NP | 0.15 | Baver y col., 1996 |
| <i>Mucor pusillus</i> | lactosa | 22 | Ismail y col., 1997 |
| <i>Paecilomyces varioti</i> | lactosa | 64 | Kelly y col., 1988 |
| Hojas de té | ONPG, lactosa | 2.7, 4.2 | Halder y Bhaduri, 1997 |

ONPG: ortonitrofenil- β -D-galactopiranosido

PNPG: paranitrofenil- β -D-galactopiranosido

Gl₆p β NP: para-nitrofenil- β -D-glucopiranosido

Debido a su pH y temperatura óptima (3.5 a 4.5 y 50-60°C), las lactasas de hongos como las de *A. niger* y *A. oryzae* están prácticamente limitadas a utilizarse en suero ácido de leche, en suero dulce previamente acidificado, o productos fermentados de leche como yogurt (Chang y Mahoney, 1989; Dziezak, 1991; Jackson y Jelen, 1989), mientras que las lactasas de levaduras (pH y temperatura óptima 6.4 a 6.8 y 35-45°C) como la de *K. lactis* se usan ampliamente en la hidrólisis de lactosa en leche y suero dulce (Castillo, 1990; García-Garibay, 1992; Mahoney, 1980).

Algunos de los pesos moleculares de lactasas se encuentran cercanos a los 200kDa o mayores; estos altos pesos moleculares sugieren la presencia de más de una subunidad, como se ha demostrado para *K. fragilis* y *K. lactis* (Castillo, 1990). Se ha reportado para *E. coli* 4 subunidades idénticas de 135 kDa (Berger y col., 1997). Para lactasas provenientes de microorganismos termófilos como *Thermus aquaticus*, *Thermoanaerobacter sp.* y *Sulfolobus solfataricus*, se han reportado valores de 440 kDa, de 150 y 240kDa respectivamente; además se ha reportado la existencia de isoenzimas para *Thermoanaerobacter sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans* y algunas especies de bifidobacterias; para *Bacillus stearothermophilus* 3 isoenzimas de 120, 95 y 70 kDa, para *K. lactis* 4 isoenzimas de 630, 550, 41 y 19 kDa (Berger y col., 1997). En la Tabla 4 se listan diferentes valores de pH óptimo, temperatura óptima y pesos moleculares para lactasas de diferentes fuentes, mismos parámetros que se determinaron para la β -glicosidasa de estudio.

Otro parámetro que puede determinar la diferencia entre una enzima y otra, es su estabilidad ante la presencia de inhibidores, sustancias que reducen la actividad de la enzima al combinarse con la misma afectando la fijación del sustrato y/o su número de recambio (Voet y Voet, 1995). La inhibición de lactasas por compuestos que reaccionan con grupos sulfhidrilo son un ejemplo, la inhibición puede ser el resultado de la reacción de un grupo sulfhidrilo esencial del sitio activo o una reacción general con grupos sulfhidrilo de la enzima para generar efectos estéricos o desnaturalización de la misma. Un grupo sulfhidrilo en el sitio activo a menudo muestra gran diferencia en reactividad comparado con los que se encuentran fuera del sitio activo (Whitaker, 1994). Por lo

anterior, muchas lactasas se inactivan por grupos sulfhidrido-alkilantes, esto podría indicar la presencia de grupos sulfhidrido que son importantes para la actividad enzimática (Castillo, 1990).

TABLA 4. PESO MOLECULAR, T Y pH OPTIMOS, PARA DIFERENTES LACTASAS

| FUENTE | Peso Molecular (Daltones) | pH óptimo | T _{óptima} (°C) | Referencia |
|---|-----------------------------------|-----------|--------------------------|--------------------------------|
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | | 7.5 | 50 | Brady y col., 1995 |
| <i>Candida pseudotropicalis</i> | | 6.2 | 45-47 | Castillo y col., 1983 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | | 6.5 | 35 | Champluvier y col., 1988 |
| <i>Candida pseudotropicalis</i> | | 6.2 | 47 | De Bales y Castillo, 1979 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> (Maxilact LX-5000) | 200,000 (2 subunidades) | | | Cavaillé y Combes, 1995 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | 135,000 | 7.25 | | Dickson y col., 1979 |
| <i>Tolulopsis versatilis</i> M6, <i>T. sphaerica</i> J28, <i>C. pseudotropicalis</i> B57, A60 | 200,000 - 233,000 | 7 ó 7.5 | 30 | Itoh y col., 1982 |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | | 7 | 50 | Ku y Hang, 1992 |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | 2 subunidades 90,000 y 120,000 | 6.5-7.5 | | Mahoney y Whitaker, 1977, 1978 |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | | 6.2 | 50 | Sánchez y Castillo, 1980 |
| <i>Saccharomyces fragilis</i> | | 6.5 | | Wendorff y Amudson, 1971 |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | | 6.86 | 43 | Carrara y Rubiolo, 1996 |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | | | 50 | Thomáska y col., 1995 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | 90,000 | 5.0 | 55-60 | Mahoney, 1985 |
| <i>Aspergillus niger</i> | | 3.6 | 50 | Papayannakos y Markas, 1993 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 116,000 | | 60 | Chang y Mahoney, 1989 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 116,000 | | | Smart y Richardson, 1987 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 530,000 | 7.1 | 55 | Mahoney, 1985 |
| <i>E. coli</i> | 540,000 | 7.2 | 40 | Mahoney, 1985 |
| <i>Bacillus sp</i> | 200 000 | 6.0 | 40 | Choi y col., 1995 |
| <i>Bacillus sp</i> | 160 000 | 6.0 | 50 | Mozaffar y col., 1984 |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | 215-230 000 | 5.8-6.4 | 65 | Mahoney, 1985 |
| <i>Thermus aquaticus</i> | 570 000 | 5.0 | 80 | Ulrich y col., 1972 |
| <i>Thermus aquaticus</i> | 700000 | 5.5 | 80 | Berger y col., 1997 |
| <i>Mortierella vinacea</i> | 62 000 | 3-4 | 60 | Shibuya y col., 1997 |
| <i>Thermotoga neapolitana</i> | 66,000 | 7.3 | 100-105 | Duffaud y McCutchen, 1997 |
| <i>Sulfolobus sulfataricus</i> | 240,000 | 6.5 | 95 | D'Auria y col., 1997 |
| <i>Pyrococcus furiosus</i> | 230 000 | 5.0 | 102-105 | Kengen y col., 1993 |
| <i>Pyrococcus furiosus</i> | 546 000 | 7.4 | 105 | Baver y col., 1996 |
| <i>Mucor pusillus</i> | 129 000 | 4.0 | 65 | Ismail y col., 1997 |
| <i>Paecilomyces varioti</i> | 94,000 | 3.5 | 50 | Kelly y col., 1988 |
| Hojas de té | 60 000 | 4.0 | 50 | Halder y Bhaduri, 1997 |

Respecto a sustancias que pueden incrementar la actividad enzimática de las β -galactosidasas se puede mencionar a la cisteína como activador; se ha propuesto que la β -galactosidasa termofílica de *Thermus aquaticus*, es una enzima sulfhidrónica que requiere

de un agente reductor para una actividad máxima y para estabilizarse (Ulrich y col., 1972); grupos sulfhidril (SH) y disulfuro (-S-S-) han sido ampliamente implicados como importantes grupos funcionales en muchas proteínas (Beverdige y Toma, 1974).

En el caso de la lactasa de *Kluyveromyces marxianus*, Mahoney (Mahoney, 1980), propuso que la proteína tiene seis grupos sulfhidrilo, de los cuales depende en gran medida su capacidad hidrolítica, ya que a medida que estos van desapareciendo o se van oxidando a enlaces disulfuro, la actividad va disminuyendo, principalmente porque su modificación lleva a cambios en la estructura terciaria de la proteína.

El papel de los iones tanto como inhibidores o como activadores, depende del origen de la enzima. En términos generales el calcio y el sodio actúan como inhibidores de todas las β -galactosidasas. A pesar de que el contenido de calcio en la leche es alto, la mayor parte de éste se encuentra asociado como fosfato de calcio coloidal o ligado a las micelas de caseínas, de modo que el calcio libre (iónico) es apenas del orden del 10% del total (unos 11-13mg/100g), por lo cual no se produce una inhibición importante de la enzima en la leche. Así mismo, las lactasas requieren cofactores catiónicos como K^+ , Mg^{2+} y Mn^{2+} , los cuales se ha demostrado que estimulan o activan lactasas de levaduras y bacterias dializadas (Castillo 1990; Cavaille y Combes, 1995). En la tabla 5 se presenta la influencia de diferentes iones sobre la actividad enzimática de lactasas provenientes de distintas fuentes.

Las proteínas de la leche al ser desnaturalizadas (por tratamiento térmico por ejemplo) pueden ser activadores de las lactasas de levadura. En 1970 Wendorff reportó que el tratamiento térmico de la leche a temperaturas de entre 63 y 85°C, 30 minutos previos a la hidrólisis, resultó en un importante aumento en la velocidad de la lactasa de *K. lactis* al hidrolizar la lactosa de la leche, efecto confirmado después por otros autores. Además, recientemente en este grupo de trabajo se demostró que existe un alto grado de correlación entre la desnaturalización de las proteínas de la leche y el aumento de la actividad de lactasa, particularmente con el aumento de los grupos sulfhidrilos expuestos por la desnaturalización de las proteínas del suero de leche (Jiménez-Guzmán, 1996); este

hecho sugiere que, al calentar la leche, aumentan los grupos sulfhidrilos reactivos, los cuales tienen un efecto activador sobre la lactasa de levadura.

TABLA 5. COMPUESTOS INHIBIDORES Y ACTIVADORES PARA DIFERENTES LACTASAS

| FUENTE | INHIBIDOR | ACTIVADORES | SIN EFECTO | REFERENCIA |
|--|--|---|---|--------------------------------|
| <i>Kluyveromyces lactis</i> (Maxilact LX-5000) | Glucosa, galactosa | K ⁺ , Mg ²⁺ estabilizan | | Cavaille y Combes, 1995 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | Ca ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ | Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , 2- mercaptoetanol | Co ²⁺ , Fe ²⁺ | Dickson y col., 1979 |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | | Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Zn ²⁺ | K ⁺ , Mn ²⁺ estabilizan | Mahoney y Whitaker, 1977 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | Ca ²⁺ , Zn ²⁺ | K ⁺ :máxima actividad | | Pivarnik y Rand, 1992 |
| <i>Saccharomyces fragilis</i> | Urea, histidina y tris Glucosa y galactosa | K ⁺ , Mn ²⁺ , Mg ²⁺ | | Wendorf y Amudson, 1971 |
| <i>Candida pseudotropicalis</i> | HgCl ₂ -AgNO ₃ , CuSO ₄ , CaCl, ZnCl, P-cloromercuribenzoato. Galactosa y galactosidos inhiben competitivamente | | Fe ²⁺ , glucosa | Castillo y col., 1983 |
| <i>Torulopsis versatilis</i> M6, <i>T. sphaerica</i> J28, <i>C. pseudotropicalis</i> B57, A60 | Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Ca ²⁺ Hg ²⁺ inhibe completamente | Mn ²⁺ | | Itoh y col., 1982 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | ninguno | No necesita | | Mahoney, 1985 |
| <i>Aspergillus niger</i> | galactosa | | glucosa | Papayannakos y Markas, 1993 |
| <i>E. coli</i> | | Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ | | Mahoney, 1985 |
| <i>Bacillus circulans</i> | P-cloromercuribenzoato | | | Mozaffar y col., 1984 |
| <i>Bacillus sp.</i> | EDTA, Zn ²⁺ , Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , xilosa, glucosa, galactosa | | | Choi y col., 1995 |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | | Mg ²⁺ | | Mahoney, 1985 |
| <i>Thermus aquaticus</i> | Mg ²⁺ - Fe ²⁺ | Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Cisteína, β-mercaptoetanol | Co ²⁺ , Mg ²⁺ | Ulrich y col., 1972 |
| <i>Thermus aquaticus</i> | Zn ²⁺ +, Fe ²⁺ , Co ²⁺ | Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Cisteína- mercaptoetanol | Mn ²⁺ | Berger y col., 1997 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | galactosa | Mg ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺ | | Smart y Richardson, 1987 |
| <i>Mucor pusillus</i> | Glucosa, galactosa, 1-4 lactona | | EDTA, Ca ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ | Ismail y col., 1997 |
| <i>Paecilomyces varioti</i> | Hg ²⁺ , Ni ²⁺ , Ba ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ | | Sr ²⁺ , Zn ²⁺ , Ca ²⁺ , Ag ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Al ³⁺ , glucosa, galactosa | Kelly y col., 1988 |
| Hojas de té | Hg ²⁺ , galactosa | | | Halder y Bhaduri, 1997 |

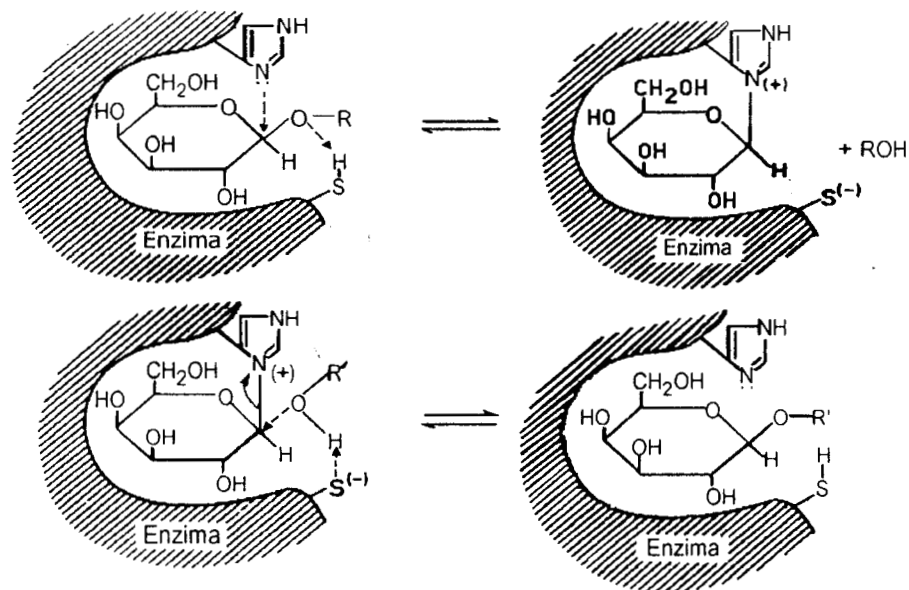
Las lactasas son normalmente inhibidas por el producto de hidrólisis galactosa, también por algunos galactósidos, pero no por glucosa, aunque enzimas de *K. fragilis* y *Saccharomyces anamensis* son también inhibidas por glucosa (Castillo, 1990) La inhibición por galactosa es de tipo competitivo. La lactasa de *A. niger* es, con mucho, la más susceptible a la inhibición por galactosa, y en orden descendente encontramos a las de *K. marxianus*, *K. lactis* y finalmente *A. oryzae* (García-Garibay y Gómez Ruíz, 1996). En un estudio de la lactasa de *K. lactis*, trabajando con concentraciones de galactosa de 0-740mM se encontró que la galactosa es un inhibidor competitivo para esta enzima y que trabajando con concentraciones de glucosa de 0-300mM se encontró que este monosacárido es un inhibidor no competitivo bajo las condiciones de estudio especificadas (Cavaille y Combes, 1995).

Se ha encontrado que la galactosamina es mejor inhibidor que galactosa, probablemente por su grupo amino cargado positivamente en el C₂. La acetilación del grupo -NH₂ elimina el efecto inhibidor para la lactasa de *C. pseudotropicalis* (Castillo, 1990, Mahoney, 1980).

Mecanismos de acción

El mecanismo de acción de la enzima postulado por Wallenfeles y Malhorta establece que la enzima transfiere la porción de D-galactosa de un galactósido (como lactosa) a un aceptor con un grupo hidroxilo R'OH (Figura 2). El grupo sulfhidrilo actúa como un ácido general para protonar el átomo de oxígeno glicosídico y el grupo imidazol actúa como un nucleófilo que ataca el centro nucleofílico del C(1) de la glicona. Se propone un intermediario covalente que involucra un enlace carbono nitrógeno. Para mover el grupo galactosil, el anión sulfhidrilo (S⁻) actúa como base general para abstraer un protón del agua (mostrado como R'OH) el cual ayuda en el ataque del OH⁻ a la posición del C(1). No existe inversión del carbón anomérico en algún paso de la reacción y el producto conserva la configuración β alrededor del carbón anomérico (Whitaker, 1994).

Cuando el aceptor del grupo galactósido es agua, se forma la galactosa; sin embargo, al igual que otras glicosidasas la transferencia puede hacerse a otros aceptores como azúcares, dando lugar a la formación de oligosacáridos.

FIGURA 2. MECANISMO DE LA β -GALACTOSIDASA

(Whitaker, 1994)

Durante la hidrólisis de lactosa se identifican hasta 12 diferentes oligosacáridos formados por transglicosilación, siendo los principales: alolactosa (β -D-galactosa (1-6) D-glucosa), galactobiosa (β -D-galactosa (1-6) D-galactosa), β -D-galactosa (1-6) alolactosa, β -D-galactosa (1-6) lactosa y β -D-galactosa (1-6) galactobiosa, siendo la más abundante la alolactosa. La cantidad y naturaleza de los oligosacáridos formados depende del origen de la enzima (se han reportado reacciones de hidrólisis y transglicosilación en enzimas de bacterias, levaduras y hongos), así como de algunas condiciones de reacción como: concentración inicial de lactosa, tiempo de reacción, pH, temperatura y iones (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996; Dickson y col., 1979; Kelly y col., 1988). Para la lactasa de *Saccharomyces lactis* se encontraron seis oligosacáridos, todos lineales y uno o dos residuos galactosil unidos por enlaces β -(1-6) a glucosa, galactosa o lactosa (Asp y col., 1980).

Berger y col. (1997) reportaron que la β -galactosidasa de *Thermus aquaticus* posee actividad de transglicosilación encontrando al final de la hidrólisis dos tipos diferentes de

oligosacáridos. Además reportaron que mientras la β -galactosidasa de *A. oryzae* produce hasta 20 oligosacáridos, otras lactasas microbianas generalmente forman -di, -tri y -tetrasacaridos o moléculas rearrregladas de lactosa como alolactosa. Itoh y col. (1982), observaron para las lactasas de *Candida* y *Torulopsis* la formación de muchos oligosacáridos formados por transgalactosilación en cromatografía en capa fina, Kelly y col. (1988) observaron mediante la misma técnica los productos finales de la enzima del hongo *Paecilomyces varioti*, con clara evidencia de actividad de transferasa.

2.3 USOS INDUSTRIALES

Hasta 1993, por lo menos el 75% de todas las enzimas industriales producidas eran hidrolasas, usadas en la depolimerización de sustancias naturales. Las proteinasas siguen siendo las dominantes por su amplio uso en la industria láctea (coagulantes) y de detergentes; juntas acumulan aproximadamente el 40% de todas las ventas de enzimas. Las carbohidrasas usadas en panadería, cervecería, destilados, almidones y textiles, representan el segundo gran grupo (Godfrey y West, 1996).

Las β -galactosidasas microbianas (lactasas) se han utilizado en forma comercial desde la década de los cincuenta, pero en forma más importante desde principios de la década de los ochentas para un gran número de productos con actividad de lactasa, algunos de los cuales se empezaron a introducir en México hace poco más de diez años (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996).

Aún cuando la utilización de lactasa en la industria láctea se da principalmente con el objeto de producir leches con lactosa hidrolizada para personas intolerantes, existen también razones técnicas para la utilización de esta enzima en la fabricación de diversos productos lácteos con diferentes fines comerciales. A continuación se citan los usos más relevantes de la lactasa.

Mejoramiento de la digestibilidad. La hidrólisis de lactosa en leche antes de su ingestión hace posible su uso en adultos o infantes intolerantes a la lactosa para que puedan consumir leche (Vega, 1996), así como en la alimentación de pacientes

por vía enteral (sonda), haciendo de la leche deslactosada un producto más económico que las formas nutricionalmente completas de importación que suelen utilizarse en estos casos. La leche con lactosa hidrolizada puede ser un excelente producto para ancianos debido a su alta densidad nutricional, y por ser un alimento líquido de fácil ingestión para ellos (Rosado y Mimiaga, 1996; García-Garibay, 1992; García-Garibay y Gómez Ruíz, 1996).

La hidrólisis de lactosa en planta (a nivel industrial) es con el fin de producir leche con bajo contenido de lactosa para su venta al público. A continuación se describen algunos procesos para la elaboración de leche deslactosada para personas intolerantes.

El uso de enzima libre para hidrólisis de lactosa en leche se hace bajo diferentes condiciones de operación, que dependen de la actividad y cantidad de enzima adicionada, y también de las características del producto terminado. Respecto a costo, es preferible usar bajas concentraciones, lo cual requiere tiempos largos de hidrólisis.

Un proceso típico con la enzima libre consiste en la adición de la lactasa de levadura a la leche previamente pasteurizada. La leche se deja incubar con la enzima a 4-6°C durante ocho horas o más, o a 35-40°C durante 2-5 horas. Después de la incubación la leche puede o no ser pasteurizada nuevamente para detener la reacción enzimática antes de envasar. A bajas temperaturas se tienen largos tiempos de hidrólisis disminuyendo el riesgo de contaminación microbiana pero disminuye considerablemente la velocidad de la reacción, lo cual hace muy prolongado el proceso (más costoso). En este sentido es útil la lactasa de *K lactis*, la cual conserva actividad aún a temperaturas de refrigeración (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996; Nijpels, 1981).

Para la elaboración de leche ultrapasteurizada deslactosada a gran escala, la compañía Tetra Pak desarrolló un proceso en Suecia en el cual la enzima se esteriliza en frío mediante filtración (usando filtros con tamaño de poro de 0.45 μ m) y se agrega a la leche ultrapasteurizada inmediatamente antes del envasado aséptico. La hidrólisis, en este caso, se efectúa en el envase, permitiendo tiempos de hidrólisis mucho más largos y por lo tanto, el uso de una menor cantidad de enzima. Se estima que la hidrólisis puede ser

casi completa (80-90%) en 7-10 días a temperatura ambiente (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996; Gekas y López-Leiva, 1985).

En México, en la década de 1980, se desarrolló una leche deslactosada en polvo fabricada por la empresa paraestatal Liconsa, con la marca Digeslac, elaborada a partir de leche en polvo que se rehidratava a una concentración de sólidos más alta de lo normal, se adicionaba la enzima *K. lactis* (Maxilact LX-500), se incubaba hasta un 90% de hidrólisis de la lactosa, se pasteurizaba y secaba nuevamente para obtener el producto en polvo; este producto, sustituto de fórmulas nutricionalmente completas dejó de elaborarse ante la reducción considerable del tamaño de la empresa Liconsa (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996).

Actualmente existe en el mercado mexicano una leche ultrapasteurizada con lactosa hidrolizada, entera (3% de grasa) y semidescremada, que se comercializa con la marca Desly, producida por la empresa privada Neolac en Querétaro. En el proceso se utiliza una lactasa de *K. lactis* con la cual se efectúa la hidrólisis antes de la ultrapasteurización, alcanzándose un 90% de conversión de la lactosa. La hidrólisis de la lactosa previa a la ultrapasteurización requiere un cuidadoso procesamiento térmico debido a que, por la mayor concentración de azúcares reductores (glucosa y galactosa), se favorece la reacción de Maillard. No obstante, la calidad organoléptica de este producto es impecable. Por otra parte, la empresa Parmalat está produciendo en México leche deslactosada ultrapasteurizada con la Técnica de Tetra Pack (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996).

En cuanto al uso de enzimas inmovilizadas para la hidrólisis de leche, existe sólo un proceso que ha logrado ser llevado a nivel comercial, en Italia. Este proceso utiliza el catalizador de Snam Progetti, y opera con una capacidad de 10 toneladas de leche por día, en la Centrale del Latte en Milán. El principal problema de la utilización de lactasa inmovilizada en leche es la contaminación microbiológica del reactor; dado que la leche es un sustrato tan rico que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos; además la dificultad que presentan las lactasa de levadura a la inmovilización debida a la

gran susceptibilidad de la enzima a agentes físicos y químicos (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996).

La compañía Lactaid puso en el mercado por primera vez a disposición del consumidor preparaciones enzimáticas de *K. lactis* que le permiten a éste hidrolizar la leche para consumo propio. El consumidor únicamente agrega unas gotas de la preparación a un envase de leche que se mantienen durante una noche en refrigeración, alcanzando así hasta un 70% de hidrólisis. Este procedimiento, aunque cómodo y eficaz, limita el consumo de leche al hogar. La demostración de que la adición a la leche de una dosis mayor de una enzima inmediatamente antes de consumirla evita la intolerancia, desembocó en el desarrollo de productos (cápsulas y tabletas) que pueden ser tomados en el momento de ingerir no sólo leche sino cualquier otro producto que contenga lactosa. Actualmente existen en el mercado varios productos de este tipo: LactAid "caplets" que pueden ser masticados o tragados, Lactrase tabletas producidas por la compañía Kremers Urban, y recientemente Dairy Ease tabletas masticables de Winthrop Consumer Products. Estos productos se clasifican como alimentos, por lo que pueden ser adquiridos en farmacias y las llamadas tiendas de salud sin necesidad de receta médica (García-Garibay y col., 1993). Esta misma estrategia la emplea en Europa la compañía Holandesa Gist Brocades con la lactasa "Kerulac". En el mercado de los EEUU existen varios productos de este tipo, que pueden ser masticados o tragados (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996).

Además de la leche existen otros productos lácteos con lactosa hidrolizada. En EEUU y en Italia se venden helados con lactosa hidrolizada, fundamentalmente para el consumo de personas intolerantes, pero también con el propósito de evitar los problemas de cristalización de la lactosa (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996).

Reducción de la cristalización. La lactosa tiene una baja solubilidad (unas 10 veces menos que la sacarosa), a 25° C la solubilidad de la lactosa es de 22g por 100mL de agua y tiende a precipitar en productos lácteos, resultando en una textura arenosa o forma depósitos en productos concentrados, azucarados o con alto contenido de sólidos, disminuyendo su aceptabilidad; esto se puede prevenir aumentando la solubilidad

mediante la hidrólisis parcial de lactosa impidiendo de esta forma que ésta cristalice (Alais, 1991; Whitaker, 1994; Dziezak, 1991; Cavaille y Combes, 1995). Lo anterior se presenta en productos con un gran contenido de sólidos como las leches condensadas y azucaradas, cajeta, flanes y helados (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996; Dziezak, 1991).

Incremento del poder edulcorante. Tomando como base el poder edulcorante de la sacarosa en forma cristalina (igual a 1), la lactosa en forma cristalina tiene un débil sabor dulce; su poder edulcorante (0.27) es menor que el de la sacarosa, mientras que el poder edulcorante de sus monosacáridos por separado es mayor (glucosa: 0.5-0.6, galactosa: 0.35) (Nogodawithana y Reed, 1993).

En leche hidrolizada este ligero incremento en el sabor dulce puede ser objetado por algunas personas; sin embargo, se ha encontrado que en general es aceptado e incluso resulta atractivo especialmente en niños y adolescentes. En otros productos se puede obtener una gran ventaja de este mayor poder edulcorante, tal es el caso de leches con sabor como chocolatadas, con vainilla, etc., leches condensadas y azucaradas y todos aquellos productos dulces en los que se utiliza leche como ingrediente, ya que se puede reducir la cantidad de sacarosa agregada. El caso del yogurt es especialmente interesante, ya que éste tiende a ser considerado como un producto dietético, pero se sabe que los yogurts dulces y con sabor son los mejor aceptados; por lo tanto si éste es elaborado con leche hidrolizada, se podrá tener un yogurt más dulce sin necesidad de agregar más calorías (García-Garibay y col., 1993).

Reducción de los tiempos de fermentación. En productos lácteos fermentados como el yogurt y quesos se reporta una disminución considerable en el tiempo de la fermentación, con mayor producción de ácido láctico, cuando se utiliza leche con lactosa hidrolizada como materia prima (García-Garibay y Gómez-Ruíz, 1996). En la elaboración de yogurt cuando se utiliza leche con lactosa hidrolizada, algunos cultivos muestran menor consumo de carbohidratos con mayor producción de acidez y biomasa, es decir, presentan mayor rendimiento que cuando se utiliza leche normal (García-Garibay, 1986).

Utilización del suero de leche. El uso de la lactasa *de hongos como A. niger y A. oryzae* es común para tratar el suero en ciudades donde se obtienen como desperdicio industrial millones de toneladas de este producto que es tirado al drenaje (Bonekamp y Oosterton, 1994; Dziezak, 1991). La lactosa presente en este suero es el principal contribuyente a la alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de aproximadamente 40 000 mg/L, la importancia de hidrolizar lactosa en suero consiste en poder utilizar el suero como materia prima en la elaboración de un producto evitando desecharlo al drenaje y contaminar (Castillo, 1990; Champluvier y col., 1988), además, puede ocasionar problemas de cristalización de la lactosa en la utilización del suero como materia prima.

Entre las aplicaciones del suero con lactosa hidrolizada se encuentran: utilizar el suero como medio de cultivo para la obtención de levadura para panificación, producción de enzimas, vitaminas, polisacáridos (xantana), en la elaboración de jarabes concentrados con 70 a 75% de sólidos que se usan como una fuente de proteínas funcionales y como edulcorantes en helados, bebidas frutales (Dziezak, 1991; Castillo y col., 1983, Gekas y López-Leiva, 1985; García-Garibay, 1992), si además ha sido deproteínizado por ultrafiltración y desmineralizado puede usarse como jarabe de azúcar similar al jarabe de maíz, cuando se concentra a 60-65% de sólidos (Dziezak, 1991).

La lactasa es una enzima cara, de ahí que la clave técnico-económica de estos procesos ha sido la obtención de catalizadores con lactasa inmovilizada con alta actividad y prolongada vida de operación. Por su pH óptimo, las lactasas de hongos son las más adecuadas para procesar el suero ácido. Debido a que las lactasas de levadura son muy susceptibles a los tratamientos fisicoquímicos necesarios para la inmovilización y aun cuando son numerosos los trabajos publicados respecto de la inmovilización de lactasas de levadura, los catalizadores comerciales que se han desarrollado son casi en su totalidad a partir de lactasas de los hongos *A. niger* y *A. oryzae*.

La tecnología que hasta ahora ha alcanzado mayor éxito es la desarrollada por la Corning Glass Works (que posteriormente formara parte de la compañía Genecor). El catalizador constó originalmente de lactasa de *A. niger* y después se sustituyó por *A. oryzae*, inmovilizada en vidrio poroso sinalizado por enlace covalente con glutaraldehído. El

proceso industrial consiste de un reactor que consta de una columna empacada, operando continuamente con flujo descendente; el suero dismineralizado se pasteuriza, se hidroliza la lactosa hasta 80% y se concentra hasta evaporación hasta 70% de sólidos; las condiciones de operación son pH 3.5 y temperatura de 32°C a 39°C. La vida del sistema es de una a dos años. La limpieza del catalizador se hace con soluciones de ácido acético diluído y con soluciones de limpieza de uso común en plantas de lácteos, por lo que aunado al bajo pH, no se presentan problemas de contaminación microbiológica. Actualmente existen tres plantas industriales operando con el catalizador de Corning (Estados Unidos, Gran Bretaña y Francia) y otras a nivel piloto.

La compañía finlandesa Valio ha desarrollado y ha mantenido en operación durante varios años en una planta de lácteos un catalizador con lactasa de *A. oryzae* inmovilizada por enlace covalente a una resina de fenol formaldehído, este sistema es aplicable tanto a suero desproteínizado como a suero entero. En 1983 la Rhom Tech introdujo al mercado un catalizador que consiste en lactasa de *A. oryzae* inmovilizada por enlace covalente a esferas porosas de polimetilmetacrilato (plexiglás), el suero se trata a pH 4.5 y a una temperatura de 50-55°C. Otros catalizadores comerciales desarrollados en los últimos años son los de la Lactohyd, el de la British Charcols and Mcdonalds, compañía filial de la Tate and Lyle, y Sumitomo; estos tres sistemas han sido empleados también en plantas piloto de escala considerable (García-Garibay y col; 1993).

Otros usos. La hidrólisis de lactosa aumenta los azúcares reductores que interaccionan fácilmente con proteínas produciendo pigmentos mediante la reacción de Maillard, es por esto que se utiliza en panificación y también en cajeta, leche quemada o arequipe (Badui, 1990; García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996).

3. MICROORGANISMOS EXTREMOFILOS

Los extraños microorganismos que habitan ambientes extremos como manantiales de agua muy caliente, aguas árticas congeladas, manantiales geotérmicos ricos en azufre, aguas altamente salinas, o hábitats extremadamente ácidos o alcalinos, o con alta fuerza iónica de sal o de metales pesados, y elevadas presiones son llamados *extremófilos*; también se han encontrado en regiones volcánicas, pozas hidrotérmicas en lo profundo del mar; fuentes calientes por sol como suelo, superficies rocosas y capas de tierra; en composta, heno, paja, aserrín, pilas de carbón, y en calentamiento de aguas, vapor industrial y líneas condensación industrial, así como de medios con azufre donde se forma la chimenea de los volcanes (Ludlow y Clark , 1991 ; Kelly y Adams, 1994). Los extremófilos son capaces de presentar un crecimiento óptimo en uno o más de los extremos citados (lo cual parece particularmente interesante), por ejemplo algunos extremófilos además de resistir altas temperaturas, son también acidófilos o alcalófilos. Algunas veces condiciones moderadas pueden ser fatales para estos microorganismos (Adams y Kelly, 1995; Ludlow y Clarck, 1991; Adams y col., 1995).

Los hipertermófilos podrían ser definidos como organismos capaces de crecer a 90°C o más, con una temperatura óptima de por lo menos 80°C (Adams, 1993). Dichos microorganismos fueron descubiertos en la década de los 80 logrando aislar una cantidad significativa de especies (a la fecha se conocen alrededor de 20 géneros diferentes (Adams, 1993; Halio, y col., 1996).

El descubrir que hace muchos siglos ambientes extremos fueron hábitats de ciertos microorganismos extremófilos ha permitido mediante muchos esfuerzos determinar sus límites absolutos de vida como temperatura, pH, presión, salinidad, fuerza iónica, etc. (Adams, 1993). Estos organismos y sus componentes celulares son atractivos porque pueden ser utilizados en procesos en un amplio rango de condiciones a diferencia de los microorganismos no extremófilos. Sin embargo, no todos los extremófilos son tan atractivos ya que algunos presentan inconvenientes para el desarrollo de bioprocesos, como crecimiento lento, bajos rendimientos celulares y alta sensibilidad a determinada temperatura u otras condiciones extremas fuera de sus condiciones óptimas de trabajo (Ludlow y Clarck, 1991).

Dentro de los extremófilos conocidos sólo hay dos géneros de bacterias consideradas como hipertermofílicas: *Thermotogata* y *Aquifex*, el resto se encuentra clasificado dentro del Reino *Archaea* (antes conocido como *Archaeobacteria*), el tercer dominio de la vida, reconocido por primera vez por Woese y colaboradores a finales de 1979 con base en el análisis del RNAr 16S (Kelly y Adams, 1994) y que han sido investigados por indicios de procesos evolutivos (Halio y col., 1996). En 1996 mediante una amplia colaboración de científicos, se descifró la secuencia completa de los nucleótidos de cada gene de *Methanococcus jannaschii* -productor de metano- extremófilo que sobrevive a temperaturas cercanas a 85°C. Los resultados confirmaron sorprendentemente la hipótesis de que la vida consiste de tres reinos principales de evolución (eucariotes, procariotes y archaea) no de eucariotes y procariotes como se describe en los libros de texto de biología clásicos. Se encontró también que *M. Jannaschii* tienen características de bacteria y eucariote, por lo que se ha propuesto que tanto archaea como los dos reinos restantes tienen un lejano antepasado común (Madigan y Marrs, 1997). El Reino Archaea incluye 19 géneros de termofílicos, extremo termófilos y bacterias hipertermofílicas (Halio y col., 1996; Herber, 1992).

Los archaea crecen en altas concentraciones de sal. La mayoría de estos extremófilos son anaerobios estrictos, proteolíticos y dependen de la reducción de azufre elemental (S⁰) para crecer (Kengen y col., 1993; Kelly y Adams, 1994). A la fecha sólo se han identificado pocos autótrofos obligados y facultativos, y algunas especies reductoras de nitrato (Kelly y Adams, 1994; Adams y Kelly, 1995).

Los géneros de hipertermófilos pueden enlistarse de forma general como se muestra en la Tabla 6.

TABLA 6. GENEROS DE HIPERTERMOFILOS

| ORDEN | GENERO |
|------------------------------------|--|
| Archaea S ⁰ dependiente | <i>Thermoproteales, Sulfolobales, Pyrodictales, Thermococcales</i> |
| Archaea sulfato reductor | <i>Archaea globales</i> |
| Archaea metanogénicos | <i>Metanococcales, Metanobacterales, Metanopirales</i> |
| Bacterias | <i>Thermotogales Aquificales</i> |

(Kelly y Adams, 1994)

Desarrollos recientes muestran claramente que los extremófilos son una buena

fuentes de enzimas de interés industrial. Algunas de estas enzimas han sido aisladas y sus genes han sido exitosamente clonados y expresados en huéspedes mesofílicos. La razón principal de seleccionar enzimas de extremófilos son su alta estabilidad a condiciones extremas de pH, temperatura, fuerza iónica, etc., y su reducido riesgo a la contaminación (Aguilar, 1996). La biotecnología de los extremófilos se encuentra aún en sus etapas iniciales, pero con un rápido desarrollo que hace prever importantes aplicaciones futuras. La aplicación de microorganismos extremófilos (hipertermofílicos, psicofílicos, acidofílicos, alcalofílicos y halofílicos, entre otros) en procesos industriales abre una nueva era en la biotecnología. Cada grupo de microorganismos tienen características únicas las cuales pueden ser explotadas para su uso en industrias biotecnológicas. Algunas aplicaciones posibles de estos se mencionan a continuación:

a) Tratamiento de desperdicios. La digestión microbiana de desperdicios orgánicos es una técnica frecuente en ingeniería sanitaria. Los procesos con hipertermófilos pueden parecer deseables porque eliminan la necesidad de enfriar aguas calientes contaminadas, aumentan las velocidades de reacción, pueden disminuir la formación de lodos, reducir la viscosidad de desperdicios en afluentes en ríos y destruirse más patógenos. b) Reacción en cadena de la polimerasa. La utilización de la Polimerasa I termoestable de un microorganismo como *Thermus aquaticus* (Taq Pol I) produce un gran número de mejoras respecto a la técnica original con la misma de microorganismos no termofílicos que detenían su trabajo en la parte de mayor temperatura del procedimiento (Madigan y Marrs, 1997). c) Transformación de carbohidratos. La cepa termofílica de *Bacillus coagulans* (60°C) es la fuente comercial de la enzima glucosa isomerasa, y la cepa de *Bacillus caldolyticus* (60°C) productora de la α-amilasa, no requiere maltosa para crecer y produce el doble de enzima a 60°C que las cepas no hipertermofílicas. d) Transformación de proteínas. La cepa de *Thermomonospora fusca* (80°C) produce una serín proteasa de gran valor comercial. La proteasa de *B. thermoproteolyticus* puede ser usada en la síntesis de aspartame. e) Análisis médicos. La glucocinasa de *B. stearothermophilus* ha sido sustituida por la hexocinasa de levadura para la detección de magnesio en suero, glucosa en suero y en orina; la ventaja de la hexocinasa hipertermofílica fue su estabilidad en almacenamiento (activa de 1-3 meses, contra pocos días de las convencionales) (Ludlow y Clarck, 1991).

3.1 EXTREMOZIMAS

Los microorganismos que habitan en ambientes extremos (como manantiales de agua muy caliente, aguas árticas congeladas, manantiales geotérmicos ricos en azufre, aguas altamente salinas, etc.) son llamados *extremófilos* y sus enzimas son llamadas *extremozimas*. (Adams y col. 1995).

Generalmente los procesos metabólicos de extremófilos involucran enzimas que funcionan de manera óptima bajo condiciones extremas (de pH, temperatura, etc.) a diferencia de microorganismos convencionales que incluyen enzimas que operan bajo condiciones moderadas. Se ha observado que no todas las enzimas de extremófilos son extremozimas (Adams y Kelly, 1995).

Las extremozimas pueden funcionar a temperaturas cercanas al punto de congelación del agua, a temperaturas de hasta 140°C, en soluciones saturadas de sal, a presiones altas, y en presencia de determinados solventes que enzimas convencionales difícilmente resistirían (Adams y col., 1995).

La ventaja del uso de extremozimas en aplicaciones industriales actuales o para nuevos procesos a base de enzimas, es su gran estabilidad, los reducidos riesgos de contaminación microbiana con reacciones a altas temperaturas (Aguilar, 1996), mayor solubilidad del sustrato y mayores tiempos de vida media a temperaturas normales de almacenamiento (Querol y col., 1996), lo cual no se logra utilizando enzimas convencionales en condiciones extremas de reacción o almacenamiento.

La forma en que las extremozimas se estabilizan bajo condiciones extremas, y particularmente a altas temperaturas es un problema aún no resuelto en bioquímica y biotecnología (la enzimología de extremófilos es mucho menos conocida que su microbiología). Una proteína hipertermofílica típica tiene de 30-40% de su secuencia idéntica a una enzima mesofílica, la diferencia en energía libre de estabilización es extremadamente pequeña. En términos de lo que se conoce hasta el momento, muchas extremozimas hipertermofílicas se parecen en estructura a las enzimas termolábiles, pero

las hipertermofílicas presentan mayor número de puentes de hidrógeno, puentes hidrofóbicos, interacciones electrostáticas, una sustitución de grupos tioles libres sensibles a la oxidación, y otras fuerzas internas que ayudan a estabilizarlas; además cambios relativamente pequeños en el contenido de aminoácidos puede incrementar significativamente su termoestabilidad (Madigan y Marrs, 1997; Ludlow y Clarck, 1991; Querol y col., 1996).

Recientemente, se han obtenido de diferentes microorganismos extremófilos un considerable número de extremozimas. Paralelo a esto se han desarrollado nuevas técnicas de ingeniería enzimática y técnicas de biología molecular, entre otras, que han permitido la obtención de extremozimas que se utilizan ya sea para el análisis de investigación básica o para aplicaciones prácticas en los laboratorios o industrias (Adams y col., 1995). La producción de grandes volúmenes de una extremozima, se logra mejor mediante técnicas recombinantes. El organismo huésped de elección para obtener la enzima para investigación es generalmente *E. coli* mientras que *Bacillus* y levaduras son normalmente mejores en la producción de enzimas industriales. Muy pocas extremozimas se usan actualmente en grandes aplicaciones, muchas otras es seguro que lo hagan en los próximos años (Adams y Kelly, 1995 ; Madigan y Marrs , 1997).

Un ejemplo de la importancia comercial de las extremozimas es la amplia aplicación de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* y *Pirococcus furiosus* en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un método rápido y eficiente de amplificar las secuencias específicas del DNA_r, ya que con polimerasas hipertermofílicas no se detiene el trabajo en la parte de mayor temperatura del procedimiento y las cuales son usadas alrededor del mundo en la ciencia forense, análisis de alimentos, medicina clínica, etc. (Aguilar, 1996). Otro ejemplo es la obtención de la alcohol deshidrogenasa secundaria termoestable de *Sulfolobus solfataricus* y de *Hypothermus butylicus*; esta enzima muestra una máxima actividad con alcoholes secundarios, tolera solventes orgánicos y tiene un gran potencial comercial especialmente en la industria farmacéutica en la producción de compuestos quirales especiales. Otro papel importante para las hipertermófilos y sus enzimas se

encuentra en las reacciones de transesterificación síntesis de oligosacáridos, síntesis de péptidos y síntesis de fosfolípidos (Herber, 1992).

Debido a que existen numerosos procesos industriales que se llevan a cabo a temperaturas que exceden los 50°C, pero no todas las enzimas los resisten, existe una presión comercial para desarrollar mediante biotecnología moderna formas termoestables de catalizadores. La tabla 7 muestra las aplicaciones de enzimas termoestables actualmente disponibles (Herber, 1992).

TABLA 7. ENZIMAS TERMOESTABLES DISPONIBLES Y SUS APLICACIONES

| ENZIMA | TEMPERATURA DE PROCESO (°C) | APLICACION |
|-----------------------------|------------------------------------|--|
| Carbohidrasas | | |
| α-amilasa (bacteriana) | 90-110 | Hidrólisis de almidón, cervecería, panadería, textiles |
| α-amilasa (fúngica) | 50-60 | Producción de jarabes de maltosa |
| Glucoamilasa | 50-60 | Hidrólisis de maltodextrina |
| Pululanasa | 50-60 | Jarabes con alto contenido de glucosa |
| Xilosa isomerasa | 50-60 | Jarabes con alto contenido de fructosa |
| Celulasa | 45-50 | Hidrólisis de celulosa |
| Pectinasa | 30-50 | Clarificación de jugos de frutas |
| Proteasas | | |
| Proteasas ácidas | 30-50 | Fabricación de alimentos |
| Proteasas neutras (fúngica) | 40-60 | Panadería, cervecería |
| Proteasas alcalinas | 40-60 | Detergentes |
| Lipasas | 30-70 | Detergentes, fabricación de alimentos |

(Herber, 1992)

Más del 80% de enzimas termoestables vendidas alrededor del mundo se utilizan en la industria de los detergentes y almidones. Las principales razones de seleccionar enzimas termoestables son su alta actividad y estabilidad (Herber, 1992).

3.2 β -GLICOSIDASAS DE EXTREMOFILOS

Las β -glucosidasas son enzimas que hidrolizan las uniones glicosídicas; en la actualidad se busca que sean más termorresistentes para darles aplicaciones en condiciones extremas. A continuación se mencionan los ejemplos encontrados de β -glucosidasas, particularmente algunas galactosidasas termorresistentes, que se han logrado obtener principalmente a partir de microorganismos hipertermófilos, así como fuentes de enzimas sacarolíticas y hemicelulíticas extremadamente termoestables las cuales podrían reemplazar a las enzimas convencionales o ser usadas en aplicaciones biocatalíticas nuevas.

Las fuentes más estudiadas de glicosilhidrolasas termofílicas han sido miembros del género eubacterial *Thermotogata*, productoras de xilosa isomerasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa, xilanasas, amilasa, celobiohidrolasa y β -xilosidasa (Duffaud y McCutchen, 1997). En la actualidad, existen ejemplos de actividad enzimática a altas temperaturas para enzimas del hipertermófilo *Pirococcus furiosus* con temperatura óptima de 95°C o mayor, algunos ejemplos son las enzimas de la Tabla 8 (Adams y Kelly, 1995).

TABLA 8. GLUCOSIDASAS Y GLUCOHIDROLASA HIPERTERMOFÍLICAS DE *P. furiosus*.

| FUENTE | ACTIVIDAD | Toptima (°C) |
|----------------------------|--------------------------|--------------|
| <i>Pyrococcus furiosus</i> | α -glucosidasa | 110-115 |
| | β -glucosidasa | 105 |
| | α -glucohidrolasa | 105 |

(Adams y Kelly, 1995)

La enzima α -galactosidasa de *Thermotogata neapolitana* es una proteína monomérica termoresistente de la que se ha reportado un peso molecular de 61 kDa con una temperatura óptima de 100 a 103°C, $t_{1/2}$ de 9h a 90°C, y 3 minutos a 100°C, $\text{pH}_{\text{óptimo}} = 7.3$, $K_m = 0.50\text{mM}$ (PNPG como sustrato). Este mismo microorganismo, también presenta actividad de mananasa y manosidasa, y las tres representan las versiones más termoestables y termoactivas de estos tipos hasta ahora reportadas y probablemente actúan sinérgicamente para hidrolizar galactomananos extracelulares a monosacáridos (Duffaud y McCutchen, 1997). Antes de ésta, la α -galactosidasa más termoestable reportada era de *Bacillus stearothermophilus*.

La β -glicosidasa del extremotermófilo archaeon *Sulfolobus solfataricus* (*S β gly*) que crece a 87°C, es una proteína tetramérica con un peso molecular total de 240kDa. Es poco activa a 30°C con actividad máxima a 95°C a pH 6.5; Moracci y col. (1997) encontraron para la misma enzima, expresada en *E. coli*, una temperatura óptima de 80°C (D'Auria y col., 1997).

Actualmente como resultado de técnicas de manipulación genética, los microorganismos son capaces de producir diversas enzimas recombinantes con diferentes funciones, aunque en realidad no existen muchos lugares en el mundo donde se reproduzca la suficiente cantidad de enzimas que cubran todas las necesidades a nivel de investigación básica e industrial. Un ejemplo de esos pocos lugares productores de enzimas recombinantes para diferentes aplicaciones es la Compañía Recombinant Biocatalysis Inc., creada a partir de 1994, desde entonces dedicada al descubrimiento, desarrollo y comercialización de nuevas enzimas para síntesis químicas y procesos industriales. Desde la creación de la compañía han sido descubiertas más de 200 nuevas enzimas, llamadas CloneZymes™, las cuales están organizadas dentro series de enzimas con funciones similares dentro de cada grupo. La compañía logró esta meta a través de los esfuerzos del personal científico que incluye químicos, biólogos moleculares, enzimólogos, y expertos en el campo de la biocatálisis.

La metodología utilizada comienza con el aislamiento de ácidos nucleicos directamente de muestras ambientales, de cultivos primarios enriquecidos, y de microorganismos purificados a través del amplio espectro de diversidad microbiana. En los siguientes pasos del proceso, se construyen bibliotecas de ácidos nucleicos purificados y se lleva a cabo un barrido para seleccionar el gene con la actividad enzimática de interés. Mediante técnicas robotizadas se lleva a cabo la secuenciación de los genes para seleccionar las características enzimáticas requeridas, es decir, al momento de hacer el barrido de los DNA y genes que tienen en las bibliotecas se escogen las regiones que se están buscando para finalmente crear una nueva enzima (Robertson y col., 1996).

Esta compañía, produce, entre otras, glicosidasas termorresistentes, para su uso en la hidrólisis de sacáridos, en la caracterización de proteínas y glicosilación de lípidos. Las

glicosidasas son específicas para la porción glicosil del sustrato y para la posición y estereoquímica de los puentes glicosídicos. Además, son usadas también en la modificación y síntesis de oligo y polisacáridos estereoespecíficos, y en la transferencia de residuos de alcoholes primarios, secundarios o terciarios para formar glicoconjugados.

3.2.1 CloneZyme GLY-001-02

La glicosidasa utilizada en este estudio proveniente de la Recombinant Biocatalysts se eligió debido a su capacidad de hidrolizar la lactosa y sus altas temperaturas de trabajo reportadas, por lo que se decidió caracterizarla bioquímica y funcionalmente a fin de conocer parámetros desconocidos para esta enzima en la actualidad. Por su parte, la compañía proporciona al usuario algunos de los parámetros para las serie de enzimas a la que pertenece la enzima utilizada. A continuación se mencionan estos parámetros:

Determinan la actividad enzimática contra diferentes sustratos, que difieren en su estructura glicosídica y configuración anomérica, entre los cuales se encuentran la β -D-celobiosa y la β -D-lactosa. El comportamiento de la enzima, temperatura y pH lo miden a concentraciones saturadas de sustrato (pNPG y pNPGP). El pH lo varían usando una serie de soluciones amortiguadoras ajustadas entre valores de 1.3 y 12.4 para así obtener el pH óptimo de la enzima (pH óptimo = 5).

Para medir la actividad, el rango de hidrólisis de p-nitrofenil α o β -glicopiranosido lo siguieron a 90°C. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de p-nitrofenolato por minuto.

Midieron la actividad de proteasa mediante hidrólisis de caseína fluorescente a pH 6 y 37°C. Todas las mediciones de actividad se compararon a los rangos de reacción para la proteinasa K y proteinasa VIII. La enzima está libre de ácidos nucleicos.

De acuerdo a las determinaciones anteriores la compañía reporta los siguientes datos para la β -glicosidasa utilizada en este estudio:

* **Estabilidad a la temperatura:** El 92% de la actividad permanece después de 145 horas a 90°C

* La Glicosidasa de estudio está esencialmente **libre de actividad proteasa.**

4. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

La enzima utilizada para este estudio fue una β -Glicosidasa CloneZyme™ de la compañía Recombinant BioCatalysis™ Inc. Gly-001-02. Se utilizaron viales de 10 mg de la glicosidasa liofilizada, que fueron suspendidos en 5mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH 6.6, posteriormente esta misma solución se diluyó 1:10. Esta solución, se utilizó para llevar a cabo las determinaciones de la caracterización de la enzima. También se utilizó la β -galactosidasa de *E. coli* como referencia (Sigma Chemicals Co. St, Louis MO, EUA, grado VIII) en algunas de las determinaciones realizadas.

4.1 DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE LA β -GLICOSIDASA

Como se indicó en la sección 3.2.1, la β -glicosidasa Gly-001-002 es capaz de hidrolizar más de un sustrato; a fin de probar su utilidad en leche, se eligió como sustrato para la enzima a la lactosa.

La determinación de actividad de la enzima, se llevó a cabo mediante la determinación del aumento de glucosa liberada por la hidrólisis de la lactosa.

La reacción de hidrólisis se efectuó en tubos de ensayo a 90°C con 0.1mL de la solución enzimática (dilución 1:10) en 0.9mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 6.6 que contenía lactosa (Sigma) al 5%.

La reacción se detuvo a los 2, 4 y 6 minutos mediante la adición de 1mL de TCA (ácido tricloroacético, J.T. Baker) al 10% para precipitar las proteínas, y se determinó la glucosa generada en cada tubo.

DETERMINACION DE GLUCOSA:

La determinación de glucosa se llevó a cabo por medio de un método enzimático GOD-PAP (SPINREACT Co.), que emplea las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa, y como compuesto cromóforo la 4-aminofenazona.

*** Reactivos:**

Se disolvió el contenido del vial que contiene las enzimas liofilizadas y la 4-aminofenazona en 250mL de solución amortiguadora de trimetilamina (TRIS), pH 7.5 (92 mmol/mL).

*** Técnica:**

Se tomaron 0.2mL de la mezcla de reacción incluyendo el TCA y se diluyeron en 1.3mL de agua destilada. Posteriormente se agregaron 30 μ L de esta dilución a 3 mL del reactivo del juego enzimático.

Se incubó 10 minutos a 37°C y se leyó a $\lambda = 505$ nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

La curva patrón se preparó utilizando una solución de 5 mg/mL de glucosa que se diluyó a diferentes concentraciones (1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 mg/mL) para cubrir un intervalo de 0 a 5 mg/mL. De la misma manera que a las muestras, también se le agregó 1mL de TCA y 1.3 mL de agua, para posteriormente llevar a cabo la determinación de glucosa.

Una Unidad Enzimática (UE) de β -glicosidasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de glucosa por minuto a 90°C, pH 6.6

4.2 DETERMINACION DE PROTEINA

La determinación de proteína total se llevó a cabo mediante el método de Lowry que se describe a continuación.

*** Reactivos:**

- a) Na₂CO₃ (J.T. Baker) al 2% en NaOH (J.T. Baker) 0.1N
- b) CuSO₄ (J.T. Baker) al 1% en H₂O
- c) Tartrato de Na y K (J.T. Baker) al 2% en H₂O
- d) Reactivo de Folin Ciocalteu (Sigma) 1:1 en agua

*** Técnica:**

Se mezclaron 50 volúmenes de a) +1 volumen de b) + 1 volumen de c), de esta mezcla se tomaron 5 mL y se les agregó 1 mL de muestra. Después de dejar reposar 10 minutos, en la oscuridad, se agregaron 0.5 mL de d). Finalmente se dejó reposar 30 minutos en la oscuridad y se leyó a $\lambda = 590$ nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

La curva patrón se preparó con una solución de 500 mg/mL de seroalbúmina bovina (Sigma) que se diluyó a diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400, y 599 mg/mL) para cubrir un intervalo de 0 a 500 mg/mL, trabajando de la misma forma que en las muestras.

4.3 ANALISIS ELECTROFORETICO DE LA β -GLICOSIDASA DE ESTUDIO

Para evaluar el grado de pureza y el peso molecular de la β -glicosidasa, se llevó a cabo un análisis electroforético de la enzima. Con el fin de identificar las bandas que correspondían a la enzima se implementó una técnica para la detección de actividad en los geles. La β -glicosidasa se comparó con la β -galactosidasa de *E. coli*, utilizada como referencia. También se hizo un análisis electroforético desnaturalizante con el objeto de determinar si la enzima presentaba subunidades y estas poseían actividad

Después de llevar a cabo ensayos con diferentes proporciones de acrilamida-bis acrilamida (T= 5%, 6.5%, 7.5%, 12%), se logró tener una mejor distribución de las bandas de las muestras problema trabajando con geles de poliacrilamida de T = 7.5% (T=[g acrilamida+g bisacrilamida]/volumen total ·100]) y una c = 5% (c=g bisacrilamida/[g acrilamida+ g bisacrilamida] ·100) para el gel de separación.

A) ELECTROFORESIS NO DESNATURALIZANTE (O NATIVA)

* Reactivos

GEL DE SEPARACION: Solución patrón con 7.125% de acrilamida y 0.375% de bisacrilamida (T=7.5% y c=5%) en solución amortiguadora 0.375 M de tris base, pH 8.8. La polimerización del gel se llevó a cabo con persulfato de amonio al 10% (50 μ L/10mL de gel) y N,N',N',N-tetrametilendiamina (TEMED) (0.1 mL/100mL de gel).

GEL DE CONCENTRACION: Solución con 2.34% de acrilamida y 0.78% de bisacrilamida (T=3.124% y c= 25%) en solución amortiguadora 0.125 M de tris base, pH 6.8. Se polimerizó con persulfato de amonio al 10% y TEMED (0.1mL/100 mL de gel).

SOLUCION AMORTIGUADORA DEL ELECTRODO (corrida): 3.6 g de tris base y 17.8 g de glicina, se llevaron a 6 litros con agua desionizada, se ajustó el pH a 8.3 con HCl 1N.

MUESTRA: 15 μ L de muestra mezclados con 5 μ L de colorante (azúl de bromofenol 0.1% + 25% de glicerol + 74.9% de agua). Se inyectaron los 20 μ L de cada muestra en los geles. Para cada gel de electroforesis se inyectó la β -glicosidasa de estudio y la β -galactosidasa de *E. coli* como referencia.

* Técnica

Para soportar cada uno de los geles se utilizaron dos placas de vidrio de 10 x 7 cm, dos separadores de 0.75 mm de diámetro y un peine del mismo espesor para marcar los carriles en los geles, cada par de placas se colocó en una cámara electroforética Mini-PROTEAN II cel (Bio Rad).

Posteriormente se llevó a cabo el corrimiento electroforético utilizando una fuente de poder Bio-Rad Power/Pac 300, a voltaje constante de 200V. Aproximadamente 40 minutos tardó el azul de bromofenol de las muestras en alcanzar la parte final del gel.

TINCIÓN Y FIJACION. Las muestras se tiñeron con Sypro™ (BioRad): se colocó el gel en una solución de ácido acético al 7.5% por 30 minutos para desaparecer la línea del frente electroforético en los geles y para fijar la proteína al gel, posteriormente se colocó el gel en una solución de SDS (dodecilsulfato de sodio, de BioRad) al 0.05% en ácido acético al 7.5% por 30 minutos, por último se colocó el gel en una solución de 25 mL de ácido acético al 7.5% + 2.5 μ L de Sypro por 30 minutos.

La digitalización de geles se llevó a cabo mediante un Gel Doc 1000 de BioRad. En la determinación del peso molecular se usó a la vez el software "Molecular Analysis", con el que se graficó el Rf de cada banda (distancia de migración desde la parte superior del gel hasta el centro de la banda de la proteína, entre la distancia que recorre el frente de color (azul de bromofenol)) vs. el log del peso molecular del patrón de referencia; posteriormente se calculó el peso molecular de cada banda mediante la extrapolación de cada una de las bandas problema en la curva patrón elaborada (Rf vs log P.M).

B) ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE

* **Reactivos**

Se utilizaron los mismos reactivos que para electroforesis no desnaturizante adicionándoles SDS al 10%.

MUESTRA. La muestra se preparó de la misma manera que para electroforesis no desnaturizante, adicionándole 1.5 μ L de β -mercaptoetanol (Sigma). De la misma forma que en la electroforésis no desnaturizante, se inyectaron la β -glicosidasa de estudio y la β -galactosidasa de *E. coli* como referencia.

* **Corrida de muestras**

Las condiciones de corrida, tinción y fijación fueron las mismas que para la electroforesis no desnaturizante

El peso molecular se les determinó a la β -glicosidasa y a la β -galactosidasa de *E. coli* tomando como referencia los pesos moleculares conocidos de un patrón de referencia BioRad (Tabla 9), que se corrió junto con las muestras. La determinación se llevó a cabo mediante electroforeisis desnaturizante.

TABLA 9. PATRON DE REFERENCIA

| Proteína | Peso Molecular |
|--|------------------|
| Miosina (músculo de conejo) | 205,000 daltones |
| β -galactosidasa (<i>E.coli</i>) | 116,250 daltones |
| Fosforilasa b (músculo de conejo) | 97,400 daltones |
| Albúmina bovina | 66,200 daltones |
| Albúmina de huevo | 45,000 daltones |

C) DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA EN GELES DE ELECTROFORESIS

Para saber cual de las bandas observadas en los geles de electroforesis desnaturalizante y no desnaturalizante para la β -glucosidasa y la β -galactosidasa de *E.coli* tenían actividad de β -galactosidasa se llevó a cabo la determinación de actividad enzimática de la siguiente forma:

Se colocaron los geles obtenidos después del corrimiento de muestras (en la fuente de poder) en una solución amortiguadora de fosfatos 50mM pH=6.6 que contenía 4-*o*-metilumbeliferil- β -D-galactósido (Sigma) durante dos horas a 37 y 70°C, según Brady, y col. (1995).

Para la detección de actividad β -galactosidasa en los geles, se utilizó el transiluminador UV del Gel Doc, donde los geles se colocaron para su visualización y fotografía; una banda fluorescente después de la incubación de los geles indica la presencia de actividad enzimática de β -galactosidasa.

4.4 DETERMINACION DE K_m y V_{max} .

Se determinó la velocidad inicial (V_o) a trece diferentes concentraciones de sustrato (lactosa en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.6): 14.61, 29.23, 43.85, 58.47, 87.71, 116.95, 146.19, 233.91, 292.39, 409.35, 584.79, 877.19, 1169.59 mM (0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 3%, 4%, 5%, 8%, 10%, 14%, 20%, 30% y 40% de lactosa respectivamente).

Con base en lo anterior se hizo una gráfica de Michaelis-Menten y los valores de K_m y V_{max} se obtuvieron mediante la gráfica de Lineweaver-Burk.

4.5 DETERMINACION DE pH OPTIMO

Se determinó la velocidad inicial con lactosa al 5%, a nueve diferentes pH: 8, 7.5, 7, 6.5, 5.5, 5, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5 y 2, con los datos obtenidos se obtuvo el pH óptimo de la gráfica de V_o vs. pH.

4.6 DETERMINACION DE LA ENERGIA DE ACTIVACION DE LA β -GLICOSIDASA.

Se determinó la velocidad inicial a seis diferentes temperaturas: 93.5, 90, 80, 70, 60, 50 °C, con lo que se observó la dependencia de la velocidad inicial con la temperatura, y con los datos obtenidos se obtuvo la Energía de activación.

4.7 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO

***Preparación de muestras:**

Las muestras se analizaron en portamuestras para materiales volátiles y se pesaron en una balanza analítica Mettler Modelo MT4 (rango 5 g, exactitud 0.010 mg).

*** Análisis de Muestras:**

Las muestras ya preparadas, se analizaron en un Calorímetro Diferencial de Barrido Perkin Elmer Modelo DSC7 bajo las condiciones de trabajo mostradas en la tabla 10 con un flujo volumétrico de nitrógeno de 50mL/min usado como purga para evitar descomposición de las muestras.

La diferencia en peso entre las muestras ①-② y ③-④, se debe a la dificultad de tomar muestras del mismo tamaño en forma sólida y líquida. En todos los casos se calentó la muestra desde la temperatura inicial hasta la temperatura final, usando la tasa de calentamiento ya seleccionada. Al final del calentamiento se mantuvo la temperatura por el tiempo indicado en la tabla 10; inmediatamente se enfrió la muestra hasta 25°C con una tasa de 320°C/min.

TABLA 10. MUESTRAS PARA EL ANALISIS POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO

| MUESTRA | RANGO DE TEMPERATURA | TASA DE CALENTAMIENTO | PESO |
|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------|--------|
| ① β-Glicosidasa | 30-300°C | 10°C/min | 1.2mg |
| ② β-Galactosidasa (E.coli) | (0" a 300°C) | | 1.4mg |
| ③ β-Glicosidasa | 25-75°C ^a (15" a 75°C) | 10°C/min 200°C/min | 6.6 mg |
| ④ β-Glicosidasa | 25-142°C ^b (2" a 142°C) | 10°C/min 200°C/min | 6.0mg |

^a Condiciones de pasteurización

^b Condiciones de ultrapasteurización

Las condiciones seleccionadas para cada muestra fueron las más adecuadas para obtener termogramas (representación gráfica del flujo de calor contra la temperatura) con eventos térmicos (picos asociados a cambios en la muestra debidos a absorción – endotérmicos - o a liberación de calor – exotérmicos) bien definidos, con buena separación de las señales. Después de llevar a cabo cada experimento se determinó la actividad residual de las muestras, como se describe en el capítulo de resultados.

La actividad residual de las muestras se comparó contra un control (hidrólisis de lactosa 5% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH 6.6, 90°C durante 6 minutos) con una velocidad inicial de 34.47 μmol/mL·min.

4.8 DETERMINACION DEL EFECTO DE LOS GRUPOS SULFHIDRILO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Con el objeto de saber si los grupos sulfhidrilo tienen un efecto similar al reportado por Wendorf para la lactasa de *K. lactis* donde al aplicar un tratamiento térmico se eleva la actividad de la enzima, en este experimento, se simuló el aumento de grupos -SH que se tiene en leche o suero agregando grupos -SH reactivos a la solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 6.6 con lactosa 5%), en forma de β-mercaptoetanol o cisteína a las diferentes concentraciones que se listan en la tabla 11 (Jiménez-Guzmán, 1996); después se midió la actividad enzimática a las diferentes concentraciones de grupos -SH agregados comparando posteriormente cada una de las actividades enzimáticas obtenidas con un control con velocidad inicial igual a 32.87 μmol/mL•min (con concentración de sulfhidrilo =0mM).

TABLA 11. CONCENTRACION DE GRUPOS SULFHIDRILO AGREGADOS

| Concentración de grupos sulfhidrilo (μM) | μL β-Mercaptoetanol/100mL de solución amortiguadora de fosfatos | mg cisteína/100mL de solución amortiguadora de fosfatos |
|--|---|---|
| Control | 0 | 0 |
| 100 | 0.70 | 1.21 |
| 150 | 1.06 | 1.82 |
| 200 | 1.41 | 2.42 |
| 250 | 1.76 | 3.03 |
| 300 | 2.11 | 3.63 |
| 350 | 2.46 | 4.24 |
| 400 | 2.82 | 4.84 |
| 450 | 3.17 | 5.45 |
| 500 | 3.52 | 6.05 |

4.9 INFLUENCIA DE CATIONES EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Se determinó la actividad enzimática en una solución de lactosa al 5% en solución amortiguadora de acetatos (en lugar de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH 6.6, para evitar precipitación de iones como el manganeso) 0.1M pH 6.6 a la cual se

adicionaron uno de los siguientes iones a una concentración de 5mM; Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , mediante los compuestos CaSO_4 (Aldrich Chemical Company), $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), MgSO_4 (J.T Baker), KCl_2 (J. T. Baker) y $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Baker) respectivamente. Las velocidades obtenidas se compararon con la obtenida en un control que no contenía ninguno de los iones antes mencionados.

4.10 INHIBICION POR PRODUCTOS DE REACCION

Se prepararon soluciones amortiguadoras (de fosfatos 0.1 M, pH 6.6) con lactosa al 5% y se agregaron diferentes concentraciones de glucosa (J.T Baker): 0.1% (5.55mM), 0.2% (11.1 mM) y 0.3% (16.6 mM). Por otra parte se trabajó con soluciones de lactosa al 5% y diferentes concentraciones de galactosa (Sigma): 0.1% (5.55mM), 0.2% (11.1 mM) y 0.3% (16.6 mM). Para cada una de las determinaciones se utilizó un control de lactosa al 5% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 6.6 (sin glucosa ni galactosa). Para el estudio de la glucosa como producto de inhibición se utilizó un blanco de glucosa para evitar interferencias.

4.11 FORMACION DE OLIGOSACARIDOS

Con el fin de determinar si la β -glicosidasa formaba oligosacáridos, se llevó a cabo la hidrólisis de una solución al 5% de lactosa a pH 6.6 y 90°C, haciendo una cromatografía en capa fina a doce diferentes tiempos de reacción de hidrólisis: 30', 60', 90', 120', 150', 180', 210', 240', 270', 300', 330', 360'. A continuación se explica el procedimiento para llevar a cabo lo anterior:

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

*** Reactivos**

Placas de sílica gel Eastman chromagram para cromatografía en capa fina 13179 sin indicador fluorescente de 10 x 20 cm.

Fase móvil: n-butanol (J.T Baker) -acetona (J.T.Baker)-solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 5 (40:50:10), según Stahl (1969).

Azúcares de Referencia: Solución de glucosa (D-(+)-glucosa anhidra, Sigma) al 0.5% en solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 6.6) (**Gluc**), Solución de galactosa (D-(+)-galactosa, Sigma) al 0.5% en solución amortiguadora de fosfatos (**Gal**), Solución de lactosa (β -lactosa, Sigma) al 0.5% en solución amortiguadora de fosfatos (**Lac**).

Solución Patrón: Solución de glucosa, galactosa y lactosa al 5% en solución amortiguadora de fosfatos (**Patrón**).

Solución reveladora: ácido sulfúrico (H_2SO_4 , J.T. Baker) al 20% en metanol (Mallinckrodt Inc.).

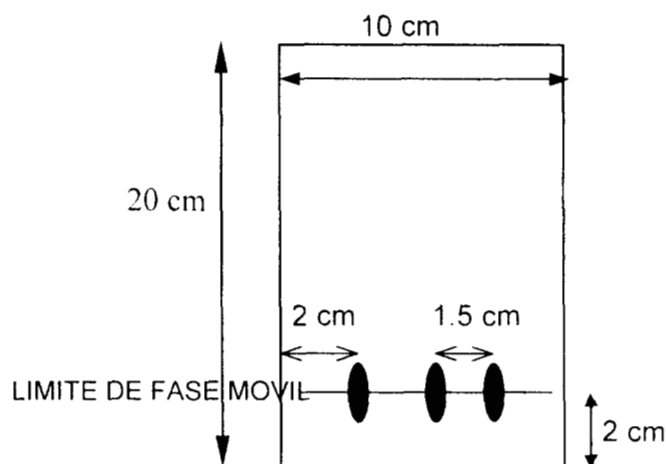
*** Técnica**

Se aplicaron 2 μ L de muestra a una distancia de 2cm del borde inferior de la placa, a 2 cm de los bordes laterales y con 1.5 cm de espaciamiento entre muestras, como se muestra en la figura 3. Se dejó secar, se aplicaron después 2 μ L más y se dejaron secar. Este proceso se repitió hasta completar 6 μ L de muestra y 4 μ L de solución patrón en total.

Se colocó la placa dentro de cámara cromatográfica previamente saturada con la fase móvil (con aproximadamente 1 cm de altura de ésta) cuidando que las muestras no tocan la fase móvil. Se eluyó hasta que el frente de la fase móvil alcanzó aproximadamente 0.5cm abajo del borde superior de la placa, este procedimiento se repitió tres veces antes de revelar la placa, la cual se dejó evaporar entre cada elución y antes de revelarse.

El revelado se llevó a cabo mediante la aspersion de la solución reveladora sobre la placa, posteriormente se colocó la placa en estufa a 120°C hasta la aparición de manchas cafés bien definidas.

FIGURA 3. DIAGRAMA DE APLICACIÓN DE MUESTRAS EN PLACA DE PLACA DE CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA



4.12 APLICACION EN LECHE

Para la β -glicosidasa de estudio se evaluó la actividad de β -galactosidasa utilizando como sustrato la leche .

Se evaluó la actividad enzimática utilizando cinco muestras de leche de dos marcas comerciales, cada una de ellas con un tratamiento térmico diferente: sin tratamiento térmico, pasteurizada y ultrapasteurizada. Las muestras utilizadas fueron:

Leche bronca (sin tratamiento térmico), leche Alpura pasteurizada, leche Alpura ultrapasteurizada, leche Lala pasteurizada, leche Lala ultrapasteurizada.

Para cada una de las muestras antes mencionadas se determinó la actividad enzimática de la β -glicosidasa como se indicó en la sección 4.1, sustituyendo para esta determinación los 0.9mL de solución amortiguadora de fosfatos por 0.9mL de leche.

Después de determinar la actividad enzimática para cada una de las muestras, se compararon sus velocidades iniciales obtenidas con un control de lactosa al 5% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 6.6.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

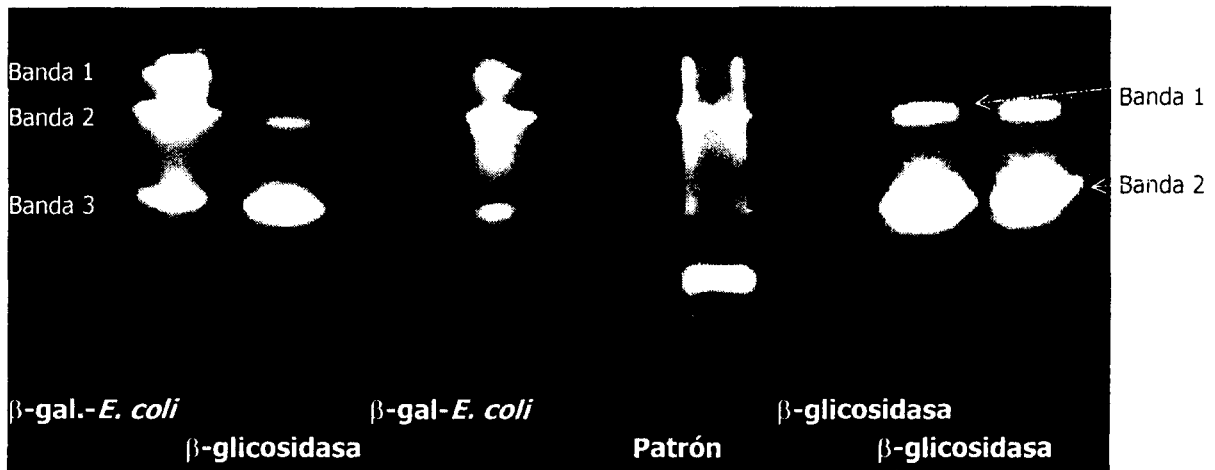
5.1 DETERMINACION DE ACTIVIDAD

La β -glicosidasa de estudio presentó una actividad de 1,965.33 UE/mg de proteína (666.66 UE/mg de polvo), medida en lactosa como sustrato, a pH 6.6 y 90°C, con un contenido de proteína de 0.545 mg/mg de polvo.

5.2 DETERMINACION DE PUREZA

En la figura 4 se muestra el patrón electroforético en el gel de poliacrilamida no desnaturalizante con las muestras.

FIGURA 4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA NO DESNATURALIZANTE

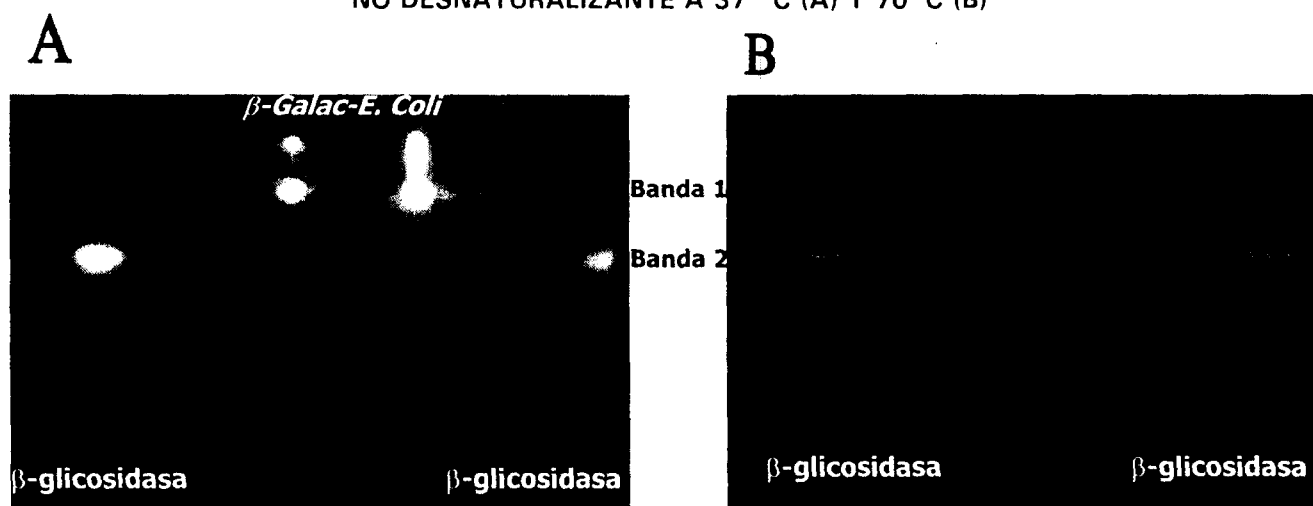


MUESTRAS: • β -galac.-*E. coli* = β -galactosidasa de *E. coli*. • β -glicosidasa, •Patrón de referencia

Con el fin de identificar cuales de las bandas corresponden a la enzima, se realizó la determinación de actividad enzimática en los geles de electroforésis tanto a 37°C (temperatura óptima de la β -galactosidasa de *E. coli*) como a 70°C. En la figura 5 se

muestran los geles de poliacrilamida obtenidos por electroforésis no desnaturalizante a 37° y 70°C.

FIGURA 5. DETECCION DE LA β -GALACTOSIDASA EN GEL DE POLIACRILAMIDA NO DESNATURALIZANTE A 37° C (A) Y 70° C (B)



MUESTRAS: • β -galac.-*E. coli* = β -galactosidasa de *E. coli*, • β -glicosidasa

Como puede observarse en la figura 5A, a 37°C, tanto la β -glicosidasa como la β -galactosidasa de *E. coli* presentan actividad enzimática, aún cuando la β -glicosidasa en la determinación de actividad en solución acuosa a 40°C no presentó actividad enzimática (sección 5.6), esto probablemente debido a que el sustrato utilizado para la sección 5.6 fue lactosa a diferencia del sustrato utilizado en esta sección (4-*o*-metilumbeliferil- β -D-galactosido), ya que posiblemente la afinidad de la β -glicosidasa no es la misma para los dos sustratos; sin embargo, esto no se sabe debido a que en solución acuosa no se determinaron ensayos utilizando 4-*o*-metilumbeliferil- β -D-galactosido. La presencia de actividad enzimática bajo estas condiciones, puede deberse también a que quizá este método es más sensible que el utilizado en la sección 5.6, sin poder compararse nuevamente debido a la diferencia de sustratos utilizados.

En esta misma figura (5A), para la β -glicosidasa se puede observar una banda fluorescente de actividad que coincide con la banda 2 observada en la figura 4, también se observa (aunque menos evidentemente) otra banda de actividad enzimática que coincide con la banda 1 de la figura 4, que aunque no se determinó cuantitativamente puede verse

que está en mucho menor proporción que la otra banda; estas mismas dos bandas aparecen en la figura 4 por lo que se puede decir que la enzima no tiene impurezas de naturaleza proteica.

Para la β -galactosidasa de *E.coli*, se puede observar que presenta dos bandas fluorescentes pegadas de actividad enzimática las cuales coinciden con las bandas 1 y 2 para la β -galactosidasa de la figura 4; la tercera banda para la β -galactosidasa de la figura 4 que no aparece en este gel puede deberse a impurezas ya que no presenta actividad enzimática, y aunque no se determinó cuantitativamente puede observarse que está en una baja concentración.

A pesar de que se sabía que la β -galactosidasa de *E. coli* no presentaría actividad a 70°C por ser una temperatura que rebasa por mucho su temperatura óptima, se decidió seguir utilizandola como referencia de lactasas convencionales respecto a la β -glicosidasa de estudio, por lo que se puede observar que en la figura 5B la β -galactosidasa de *E. coli* no presenta ninguna banda de actividad enzimática. En la figura 5B también se puede observar que la β -glicosidasa de estudio presenta una banda fluorescente de actividad enzimática, parecida a la banda 2 que se presenta en la figura 5A, lo cual nos confirma que la enzima mantiene su actividad enzimática a 70°C bajo las condiciones mencionadas, aunque realmente se esperaba que las dos bandas aparecieran nuevamente en el gel a 70°C dado que en solución acuosa la enzima se mantiene activa a 90°C, sin embargo no se tiene en realidad una explicación para la desaparición de una de las dos bandas.

Se han encontrado resultados similares a los anteriormente expuestos pero a diferente temperatura, por ejemplo, para la cepa de *K. marxianus* (temperatura óptima = 50°C), se encontró que tenía una banda de actividad de β -galactosidasa después de someterla a condiciones de electroforesis no desnaturizante e incubarla a temperatura ambiente de 2 a 5 horas con metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido 5mM (Brady y col., 1995).

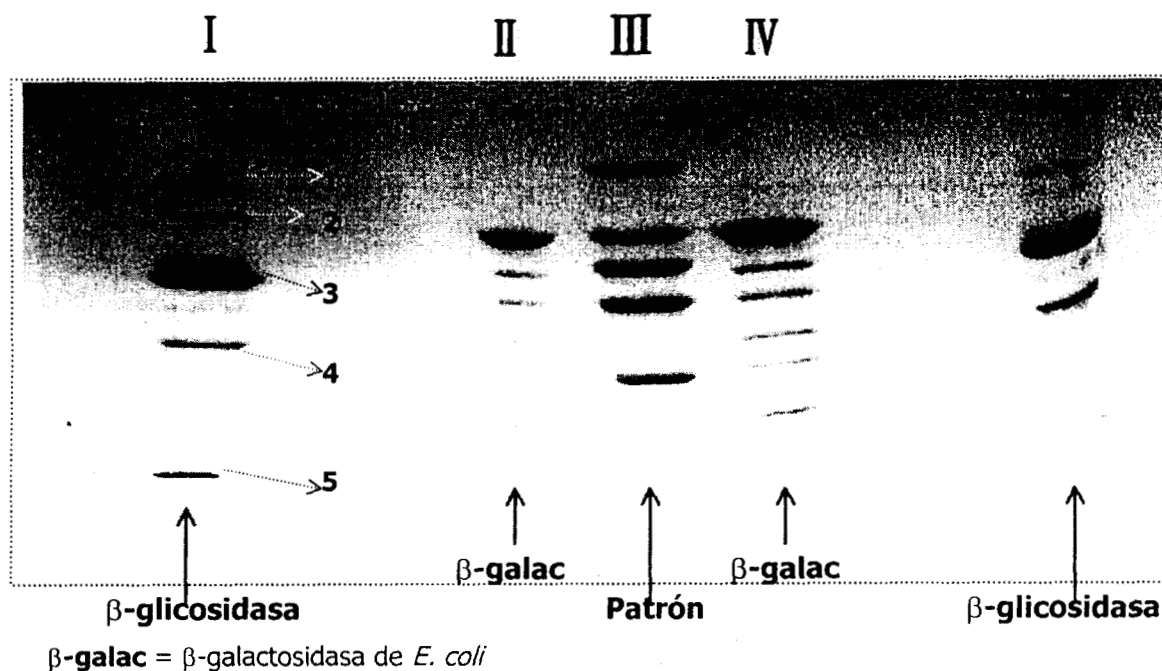
En 1997 Berger y col. reportaron que después de la incubación del gel de poliacrilamida en una solución de metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido 2mg/mL a pH 6.5 se observaron dos bandas de actividad enzimática en la β -galactosidasa de *T. aquaticus*.

Halder y Bhaduri (1997) no encontraron la presencia de isoenzimas para la lactasa de hojas de té bajo las mismas condiciones antes mencionadas, sin reportar en ambos casos la temperatura de incubación de los geles.

5.3 DETERMINACION DE PESO MOLECULAR

Se determinaron los pesos moleculares para las 5 bandas que aparecieron en la β -glicosidasa (carril I), y las seis de la β -galactosidasa de *E. coli* (carril IV), utilizando como referencia el patrón del carril III. En la figura 6 se muestra el gel de la determinación, posteriormente en la tabla 12 se reportan los pesos moleculares obtenidos para cada banda de acuerdo a la numeración que se marcó en el gel de la figura 6.

FIGURA 6. DETERMINACION DE PESO MOLECULAR EN ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE



Las bandas fueron designadas de arriba hacia abajo en el gel de la figura 6 en los carriles I, IV y III y a cada una de éstas se le determinó el peso molecular que se reporta en la tabla 12.

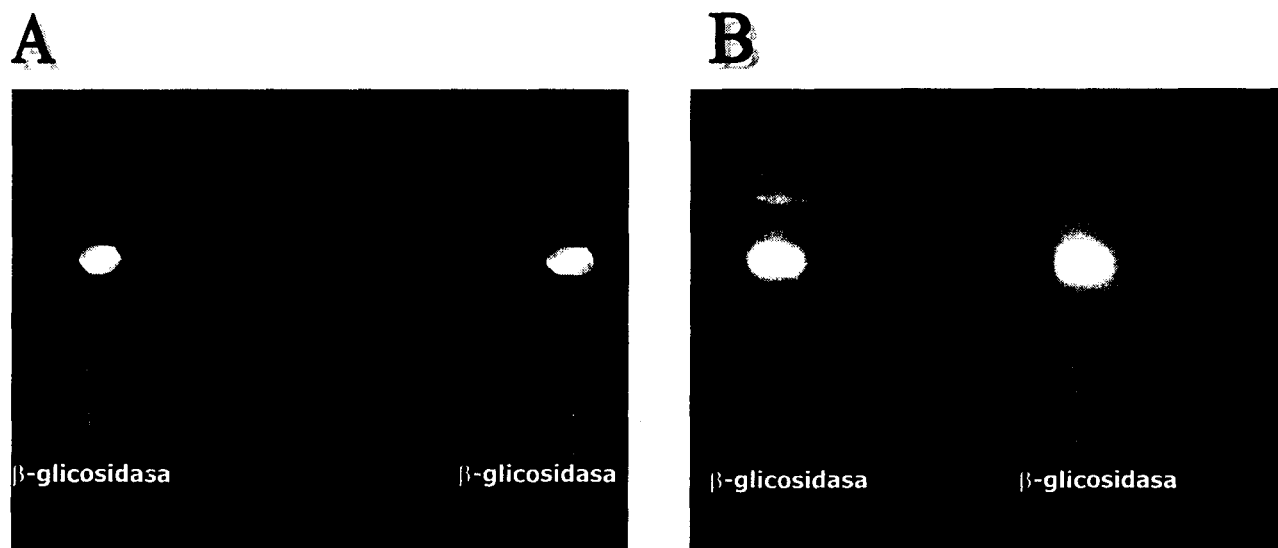
TABLA 12. PESOS MOLECULARES (DALTONES)

| BANDA | β -Glicosidasa (carril I) | β -Galactosidasa (<i>E.coli</i>) (carril IV) | Patrón de referencia (carril III) |
|-------|---------------------------------|--|-----------------------------------|
| 1 | 212 763 | 115 792 | 200 000 |
| 2 | 175 752 | 94 149 | 116 250 |
| 3 | 102 020 | 77 779 | 97 400 |
| 4 | 68 590 | 60 292 | 66 200 |
| 5 | 30 562 | 52 246 | 45 000 |
| 6 | | 49 023 | |

Para determinar si las bandas encontradas en electroforésis desnaturizante de la β -galactosidasa de *E.coli* o de la enzima de estudio (figura 6) eran subunidades activas con actividad de lactasa, se decidió llevar acabo la determinación de actividad β -galactosidasa en geles de poliacrilamida tanto a 37°C (temperatura óptima de la β -galactosidasa de *E.coli*) como a 70°C.

En la figura 7 se muestran los geles obtenidos por electroforesis desnaturizante a 37°C y 70°C.

FIGURA 7. DETECCION DE LA β -GALACTOSIDASA EN EL GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE A 37°C (A) Y 70° C (B)



MUESTRAS: ● β -Galac-*E. Coli*, = β -Galactosidasa de *E. coli*, ● β -glicosidasa

De la misma forma que para electroforesis no desnaturizante se decidió usar la β -galactosidasa de *E. coli* como referencia aún a 70°C sabiendo que no presentaría bandas de actividad enzimática residual como se observa en la figura 7, sin embargo, también se observó que la β -galactosidasa de *E. coli* no presentó actividad residual a 37°C dadas las condiciones severas del análisis.

En la figura 7 A se observó para la β -glicosidasa una banda fluorescente misma que coincidía con la banda número 3 del carril I de la figura 6.

En la figura 7 B se pueden observar la presencia de tres bandas fluorescentes de actividad enzimática las cuales coinciden con las bandas 1, 2 y 3 del carril I de la figura 6. Las bandas 4 y 5 del carril I de la figura 6 pueden ser subunidades inactivas de la enzima dado que no presentaron actividad enzimática en los geles; de acuerdo a esto el peso molecular de las subunidades de la β -glicosidasa son 212 763, 175 752 y 102 020 Da (determinados a partir del gel de la figura 6), dado que fueron las bandas que presentaron actividad de β -galactosidasa en geles.

Para la β -galactosidasa de *E. coli* se encontraron seis bandas (carril IV de la figura 6) por electroforesis desnaturizante, a las cuales se les determinó el peso molecular, sin embargo, dado que ninguna de las bandas presentó actividad en geles no se puede decidir acerca del peso molecular de la enzima.

Al comparar los resultados de electroforesis no desnaturizante, donde la enzima se encuentra en su forma nativa (figura 4), con los resultados obtenidos en ésta sección, podemos observar que para la β -glicosidasa, las dos bandas con actividad de lactasa que aparecen en la figura 4 se convierten ahora en 5 bandas o subunidades donde sólo tres presentan actividad de lactasa, las restantes dos bandas que no tienen actividad de lactasa pueden ser subunidades inactivas de la enzima.

Como se puede observar en la figura 5, el número de bandas con actividad a 37°C y 70°C no son las mismas como se esperaba, dado que a 70°C parece haber la

desnaturalización de una de las bandas, y por otra parte, en la figura 7 a 37°C y 70°C se presenta también diferente número de bandas apareciendo dos bandas más a 70°C, no se sabe en realidad la explicación para estos resultados, ya que en un principio se esperaba que en electroforesis desnaturizante al momento de determinar actividad de β -galactosidasa en geles el número de bandas fuera similar en 37 y 70°C, y de forma similar para la no desnaturizante, lo cual no sucedió; sin embargo, se puede concluir que el objetivo planteado para este experimento se cumplió ya que se logró observar el número de bandas para cada muestra y posteriormente, como se planteó, observar cuáles de esas bandas tenían actividad enzimática.

El peso molecular de β -galactosidasas como la de *K. lactis* es de 200 000 Da (Maxilact LX-5000), mientras que la β -galactosidasa de *E.coli* presenta 4 subunidades idénticas de 135 000 Da; (Cavaille y Combes, 1995; Berger y col., 1997), valor menor respecto al reportado por Berger y col. (1997), para la β -galactosidasa purificada de *Thermus aquaticus*, enzima con un inusual alto peso molecular, mayor a 700 000 Da y con una subunidad de 59 000 \pm 1 Da. D'Auria y col. reportaron en 1997 que la β -glucosidasa de *Sulfolobus solfataricus* es una proteína tetramérica con un peso molecular total de 240 000 Da.

5.4 DETERMINACION DE K_m Y V_{max}

Mediante el método de Michaelis-Menten se graficaron los datos obtenidos al variar las concentraciones de lactosa de 14.61 a 1169.59 mM (0.5-40% de lactosa) a 90°C, pH 6.6 como se muestra en la figura 8, y por el método linearizado de Lineweaver-Burk se obtuvieron los parámetros cinéticos de K_m igual a 234.41 mM y V_{max} igual a 102.77 μ mol/mL•min (Figura 9).

FIGURA 8. REPRESENTACION DE V_o DE UNA REACCION DE MICHAELIS MENTEN, VARIACION DE LA CONCENTRACION DE LACTOSA vs. V_o .

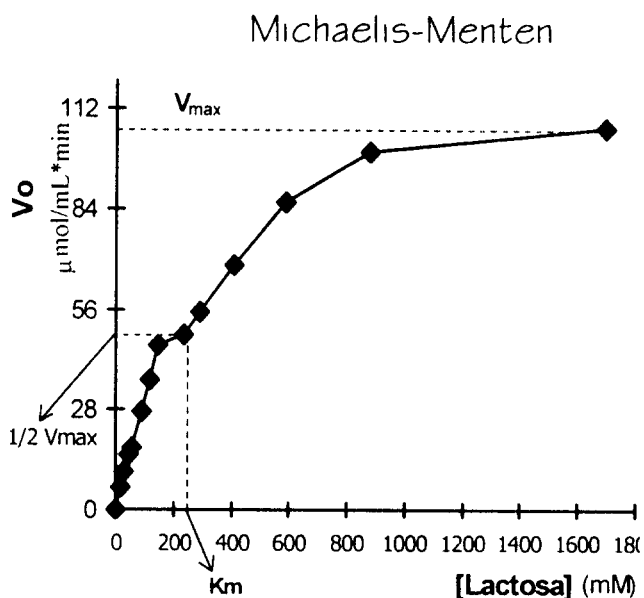
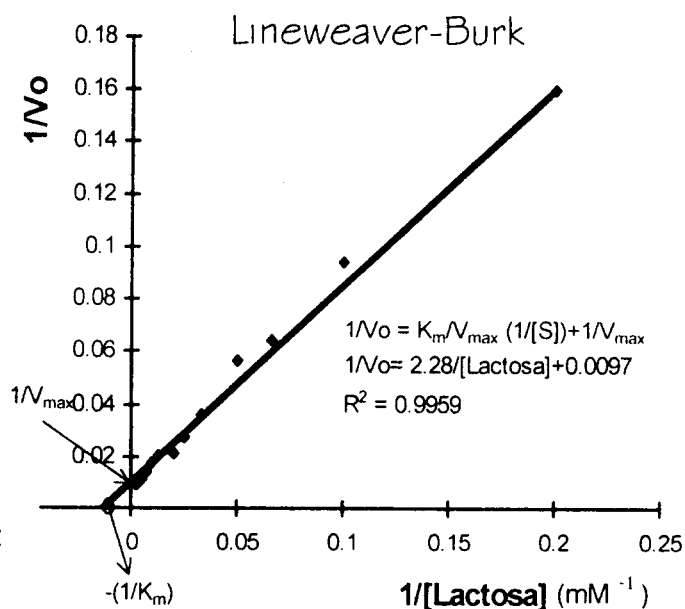


FIGURA 9. GRAFICA DE LINEWEAVER.BURK DE LOS DATOS MOSTRADOS EN LA FIGURA 8, $1/[LACTOSA]$ vs. $1/V_o$.

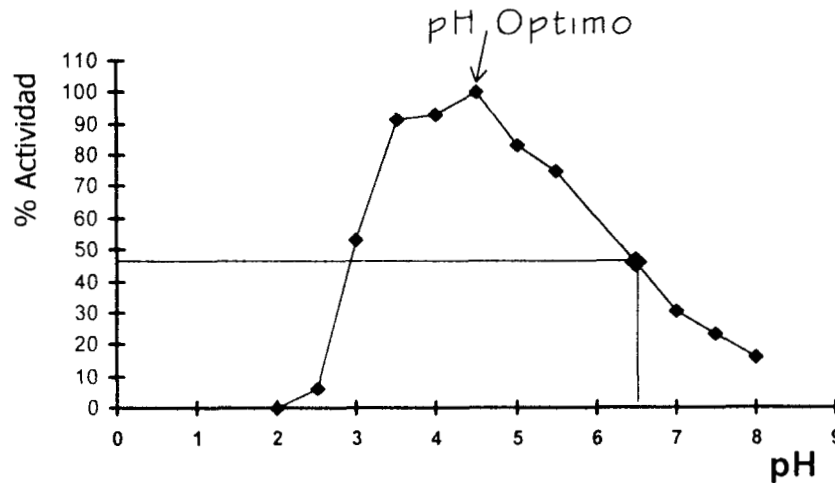


El valor de K_m obtenido para la β -glicosidasa (234.41 mM, 8.16%) de estudio respecto a β -galactosidasas como la de *E. coli*, *K. lactis* y *A. niger* con valores de 17mM, 17.3 mM y 20-85 mM respectivamente (Mahoney, 1985; Cavaille y Combes, 1995), es mayor, lo cual se atribuye a la afinidad que tiene la β -glicosidasa por más de un sustrato como se mencionó en la sección 3.2.1; es decir, la afinidad de la β -glicosidasa por la lactosa es menor que para lactasas convencionales y para algunas no convencionales como lo reportó Berger y col. en 1997 para la β -galactosidasa de *Thermus aquaticus* con un K_m de 60 mM utilizando lactosa como sustrato a 70°C.

5.5 pH OPTIMO

Mediante la variación del pH de reacción en un rango de 2-8 se obtuvo el pH óptimo de la β -glicosidasa (Figura 10) el cual fue de 4.5 a 90°C.

Tomando como el 100% de actividad al máximo valor obtenido de pH, se obtuvo que a un pH de 6.6 (pH de la leche) la β -glicosidasa conservó el 47% de su actividad.

FIGURA 10. EFECTO DEL pH SOBRE LA V_0 DE LA β -GLICOSIDASA

El pH óptimo de la β -glicosidasa de estudio, como se puede observar, se encuentra dentro del rango de pH óptimo de lactasas provenientes de hongos (3-5), lo cual nos podría sugerir otra alternativa de uso de esta enzima: su utilización en la hidrólisis de lactosa en suero, dado su pH óptimo.

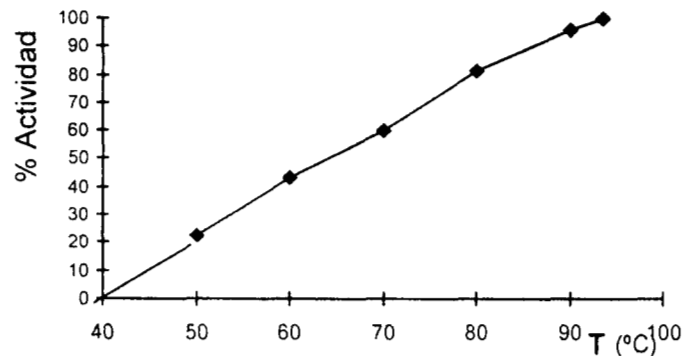
Para lactasas convencionales como la de *K. marxianus* se tiene un pH óptimo de 6.6 a 37°C y para la lactasa de *E. coli* un pH óptimo de 7.2 a 40°C (Brady y col., 1995; Mahoney, 1985); para una β -galactosidasa termorresistente de *T. aquaticus*. Berger y col. (1997) reportaron un pH óptimo de 5.5 a 70°C; todos los pH óptimos de las lactasas mencionadas, son pH cercanos al pH de la leche.

5.6 DETERMINACION DE LA ENERGIA DE ACTIVACION DE LA β -GLICOSIDASA

El estudio se realizó determinando la velocidad inicial en un rango de 50 a 93.5°C (máximo posible en sistema acuoso a presión atmosférica), observando un aumento en la V_0 a medida que aumenta la temperatura.

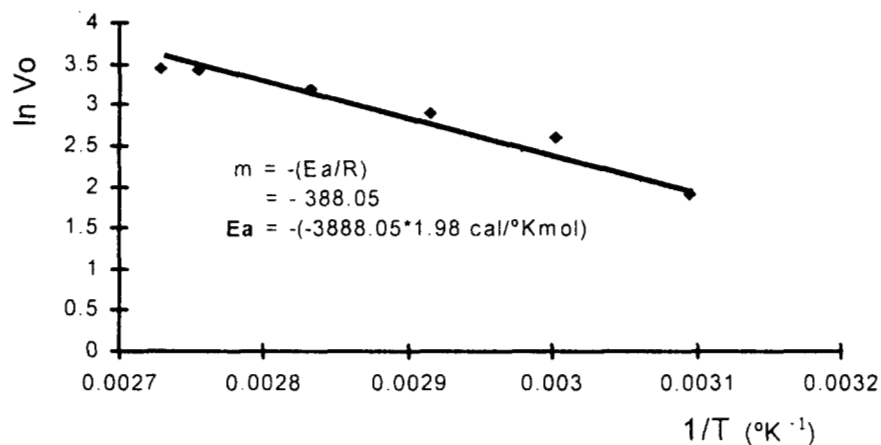
La β -glicosidasa presentó la máxima actividad enzimática a 93.5°C sin que la enzima llegara a desnaturalizarse en el tiempo que duró el ensayo (Figura 11).

FIGURA 11. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA β -GLICOSIDASA



La Energía de Activación se determinó mediante el método de Arrhenius de acuerdo a los datos de la gráfica anterior, con lo cual se obtuvo una energía de activación de 7.698 kcal/mol (figura 12).

FIGURA 12. DETERMINACION DE ENERGIA DE ACTIVACION DE LA β -GLICOSIDASA



En la figura 12 se observa que al aumentar la temperatura la velocidad de hidrólisis de lactosa aumenta, este proceso tiene una energía de activación igual a 7.698 kcal/mol.

D'Auria y col., reportaron en 1997 para una β -glicosidasa de *Sulfolobus solfataricus* apenas activa a 30°C, una actividad máxima a 95°C a pH 6.5. Moracci, y col. (1997) reportaron para la β -glicosidasa de *S. solfataricus* una temperatura óptima de 80°C y una $Ea = 81.6 \text{ kJ/mol}$ (19.4 kcal/mol), valor mayor que para la β -glicosidasa de estudio, lo que nos indica que la β -glicosidasa de estudio al tener una energía de activación menor,

requiere menos energía para llevar a cabo la reacción que la β-glicosidasa de *S. solfataricus*. Por otra parte, comparando el valor con una β-galactosidasa convencional de *K. fragilis*, con $E_a = 9.1$ kcal/mol, se observa que el valor es relativamente más alto que para la β-glicosidasa de estudio. De acuerdo al orden de magnitud de estos resultados la energía de activación para estos casos es mayor para la β-glicosidasa de *S. solfataricus*, seguida por la β-galactosidasa de *K. fragilis* y menor para la β-glicosidasa de estudio.

5.7 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO

Para la caracterización térmica de la enzima se obtuvieron termogramas por calorimetría diferencial de barrido bajo tres condiciones distintas como se mencionó en la sección 4.7.

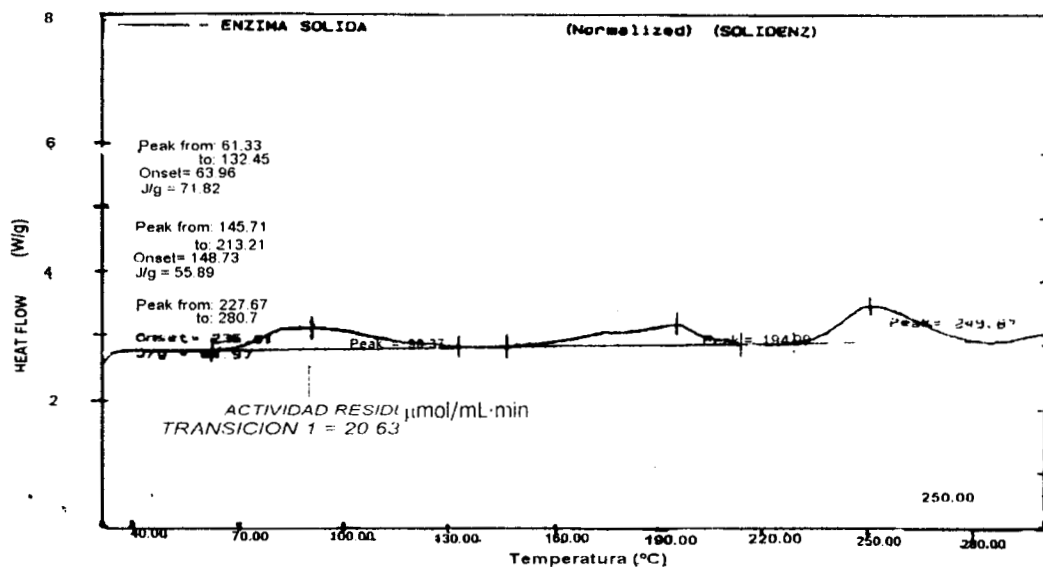
En la figura 13 se muestra el termograma correspondiente a la primer condición, obtenido después de realizar un barrido de temperatura de 30-310°C de la β-glicosidasa sólida, en el cual se presentan tres eventos térmicos, exotermas, con diferentes temperaturas de inicio; para el primero y segundo se observan transiciones que sugieren la presencia de más de un componente, pues se presenta una descompensación asimétrica en el pico, es decir, se podría hablar de la evaporación de algún compuesto más otra reacción como oxidación (el rango de temperatura de los picos es muy ancho, lo que comúnmente se asocia a procesos de oxidación).

La primera exoterma con una temperatura de inicio de 63.96°C puede asociarse a descomposición de compuestos de bajo peso molecular y la evaporación de materiales ligeros junto con la evaporación del agua (punto de ebullición a 586 mm Hg de 93.5°C). No se observa presencia de agua de hidratación debido a que esta transición tiene un rango de temperatura muy amplio.

La segunda exoterma con temperatura de inicio de 148.73°C y la tercera con 235.61°C corresponden a la pérdida de materiales por oxidación de la fracción de materiales pesados. La presencia de estos eventos nos indica la existencia de concentración alta de material de peso molecular elevado.

El tercer pico dada su temperatura de inicio y la naturaleza del evento térmico, se puede asociar a la combustión del material y descomposición completa del primer y segundo pico. En este termograma se presentan más de dos materiales con diferente peso molecular (más de dos eventos térmicos) lo cual es similar a los resultados obtenidos en la sección 5. 3 en la figura 6, donde también se observan más de dos componentes de la enzima (de diferente peso molecular), los cuales podríamos asociar a evaporación y oxidación como se concluyó para el termograma de la figura 13.

FIGURA 13. TERMOGRAMA DE β -GLICOSIDASA SOLIDA DE 30-300°C

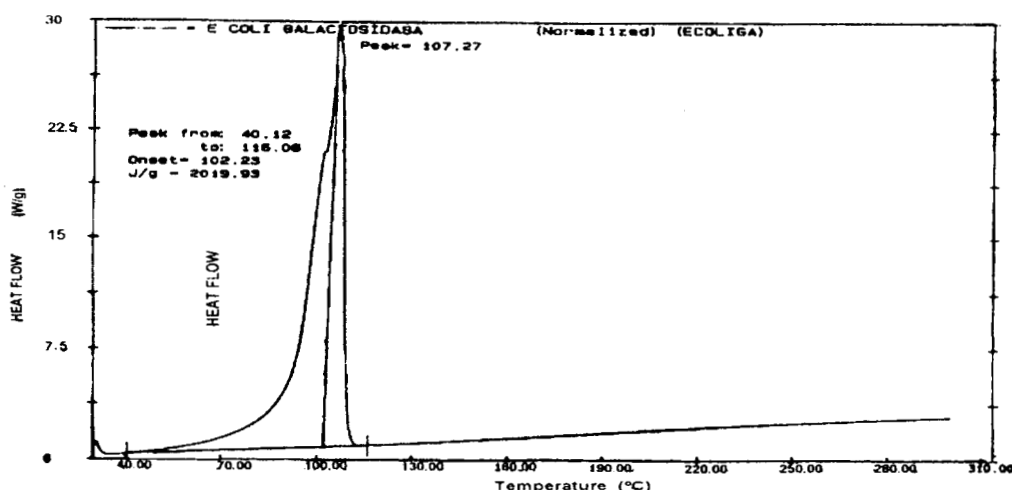


Para determinar en que evento térmico se desnaturaliza la enzima, se procedió a medir la actividad residual en diferentes muestras después de haber sido calentadas hasta la terminación de cada una de las transiciones. Sólo después de la primera transición (61.33-132.45°C) se obtuvo actividad residual con una velocidad inicial de 20.63 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$, lo cual al compararse con el control nos indica que la enzima no llega a desnaturalizarse en el rango estudiado.

Bajo la primera condición de trabajo, también se analizó la β -galactosidasa de *E.coli* en solución en un rango de temperatura de 30-310°C, como se describió anteriormente para las otras muestras, donde se pudo observar la presencia de una transición, asociada

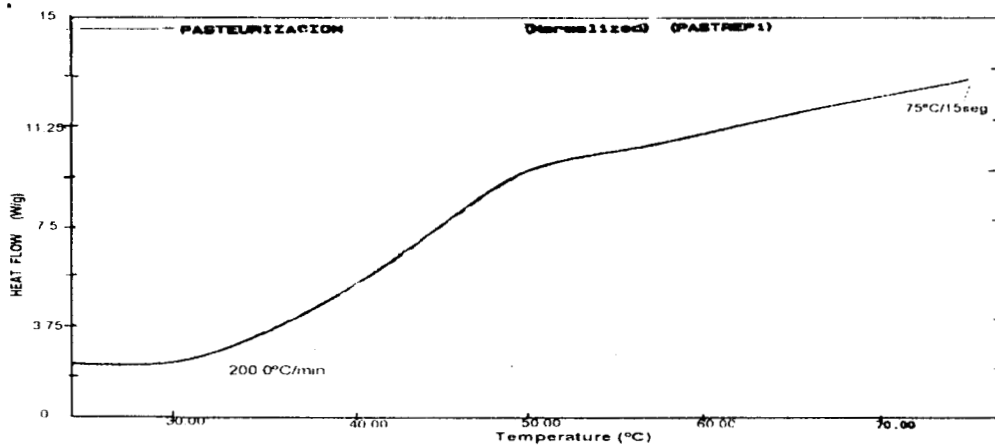
a evaporación del agua junto con otro proceso de la enzima a esta temperatura pues el pico que se observa presenta una descompensación asimétrica, ya que parece haber un pico pequeño y uno mas alto, lo que nos indica un proceso combinado (ver figura 14). Esta muestra no presentó actividad residual, lo cual indica que en la transición observada (que comienza aproximadamente a 40°C) ocurre la desnaturalización de la enzima.

FIGURA 14. TERMOGRAMA DE β -GALACTOSIDASA DE *E. coli*



La segunda condición estudiada por calorimetría diferencial de barrido corresponde a una muestra de β -glicosidasa en solución acuosa en un rango de temperatura de 25-75°C con una tasa de calentamiento de 200°C/min y un tiempo de 15 segundos a 75°C, para simular el proceso de pasteurización; también se realizó otro análisis con una tasa de calentamiento de 10°C/min. Para estas dos muestras se encontraron velocidades iniciales de 41.10 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ para 200°C/min y 39.61 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ para 10°C/min. Estos resultados indican que a una temperatura máxima de 75°C la enzima no llega a desnaturalizarse. En la figura 15 se muestra el termograma obtenido de la β -glicosidasa con una tasa de calentamiento de 200°C/min.

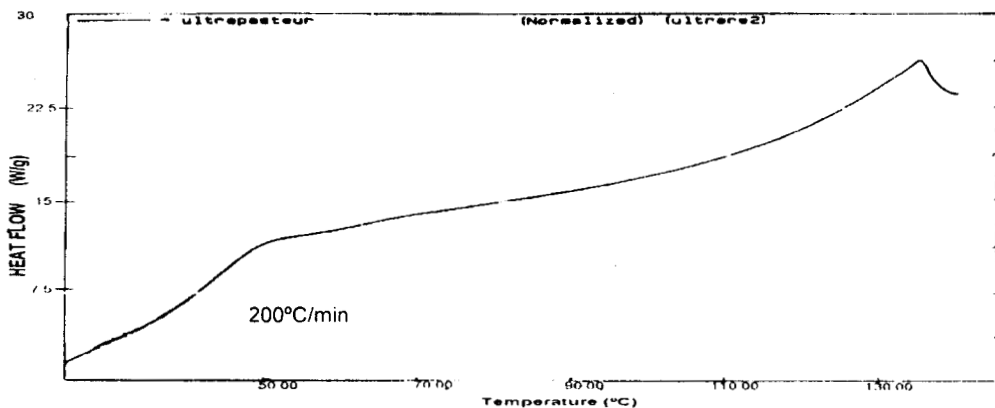
FIGURA 15. TERMOGRAMA DE β -GLICOSIDASA 75°C/15 seg



La tercera condición consistió en el calentamiento de la β -glucosidasa hasta 142°C (temperatura de ultrapasteurización). En la figura 16 se muestra el termograma obtenido de la β -glucosidasa en solución, calentada en un rango de temperatura de 25-142°C con una tasa de calentamiento de 200°C/min y 2 segundos a 142°C. Para este caso se obtuvo una velocidad inicial de 19.99 $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$.

Para la muestra a 142°C, con una tasa de calentamiento de 10°C/min no se determinó la actividad residual, ya que dadas las condiciones del ensayo (un mayor tiempo que para 200°C/min) en la muestra, se evaporó el agua, quedando la muestra pegada al portamuestra, sin ser posible disolverla.

FIGURA 16. TERMOGRAMA DE β -GLICOSIDASA 142°C/2 seg



Los resultados en esta sección por medio de calorimetría diferencial de barrido nos permitió evaluar la estabilidad térmica de la enzima de estudio bajo diferentes condiciones de temperatura. En la tabla 13 se muestra bajo que condiciones de temperatura la enzima mantiene su actividad de lactasa.

TABLA 13. % ACTIVIDAD RETENIDA

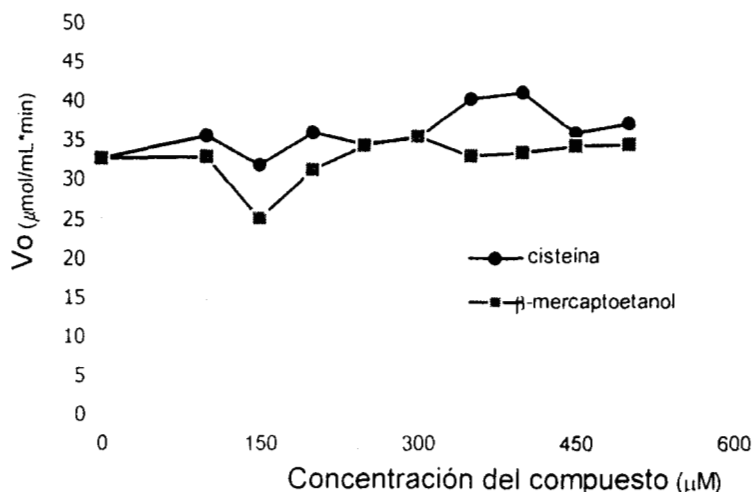
| | RANGO DE CALENTAMIENTO (°C) | TASA DE CALENTAMIENTO | ACTIVIDAD ($\mu\text{mol/mL min}$) | % ACTIVIDAD RETENIDA RESPECTO AL CONTROL |
|----------------------|------------------------------------|------------------------------|--|---|
| CONTROL | Ninguno | | 34.47 | 100 |
| β -glicosidasa | 61.33-132.45 | 10°C/min | 20.63 | 59.84 |
| β -glicosidasa | 25-75, 15 seg | 10°C/min | 39.61 | 114.91 |
| β -glicosidasa | 25-75, 15 seg | 200°C/min | 41.10 | 119.23 |
| β -glicosidasa | 25-142, 2 seg | 200°C/min | 19.99 | 57.99 |

Como se puede observar en la tabla 13, al someter a la enzima a un calentamiento de hasta 142°C durante 2 segundos (condiciones de ultrapasteurización) la enzima mantiene el 59% de su actividad enzimática. A 75°C como temperatura máxima durante 15 segundos (condiciones de pasteurización) la enzima no pierde actividad enzimática y como se observa es mayor respecto al control, sin embargo, no se tiene en realidad una explicación exacta para estos resultados aun cuando podría atribuirse a un error experimental.

5.8 DETERMINACION DEL EFECTO DE LOS GRUPOS SULFHIDRILO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

En la figura 17 se muestran los datos de V_0 obtenidos a diferentes concentraciones de grupos sulfhidriilo agregados como mercaptoetanol y cisteína.

FIGURA 17. GRAFICA DEL EFECTO DE GRUPOS SULFHIDRILLO



Como se puede observar en la figura 17, al agregar diferentes concentraciones de mercaptoetanol y cisteína, aún cuando se observa una disminución de la V_o a 150 mM, no existe diferencia significativa en ningún otro punto respecto al control. Se observa en esta figura que cuando se uso mercaptoetanol y cisteína el comportamiento es casi el mismo y en ninguno de los dos casos existe una tendencia clara en la adición de los grupos sulfhidrilo y tampoco existe diferencia significativa respecto al control. Se puede concluir que no existe influencia de los grupos sulfhirilo sobre la actividad enzimática con la adición de grupos sulfhidrilo.

El objetivo de este experimento fue determinar si una mayor concentración de grupos sulfhidrilo causa un incremento en la V_o de la enzima como sucede con la β -galactosidasa de Maxilact, donde la actividad de lactasa está estrechamente ligada al contenido de grupos $-\text{SH}$ reactivos presentes en el suero de leche y varía en forma proporcional a éstos. Para esta galactosidasa, a medida que aumenta el tratamiento térmico en la leche o suero, aumenta la exposición de grupos $-\text{SH}$, lo que provoca un aumento en la actividad enzimática; es decir, una mayor cantidad de grupos sulfhidrilo presentes en la reacción promueven un aumento en la actividad enzimática de la lactasa. También se ha observado para esta enzima que al agregar grupos $-\text{SH}$ exógenos (cisteína o β -mercaptoetanol) a una solución amortiguadora, la actividad de la β -galactosidasa

aumenta de manera proporcional a la concentración de grupos -SH agregados, hasta alcanzar un valor máximo (Jimenez-Guzmán, 1996).

5.9 EFECTO DE CATIONES EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

En la tabla 14 se reportan las velocidades iniciales obtenidas con los cinco diferentes iones y el control utilizado.

TABLA 14. EFECTO DE CATIONES EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

| ION | COMPUESTO | Vo ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$) | EFFECTO (significancia $\alpha=0.01$) |
|------------------------|---|---|---|
| CONTROL | LACTOSA 5% | 34.47 | |
| Ca²⁺ | LACTOSA 5% + CaSO ₄ 5mM | 24.55 | Negativo |
| Na⁺ | LACTOSA 5%+ CH ₃ COONa·3H ₂ O 5mM | 26.01 | Negativo |
| Mg²⁺ | LACTOSA 5% + MgSO ₄ 5mM | 28.83 | Ninguno |
| K⁺ | LACTOSA 5%...+ KCl ₂ 5mM | 30.62 | Ninguno |
| Mn²⁺ | LACTOSA 5%...+ MnSO ₄ ·H ₂ O 5mM | 40.97 | Activa |

Comparando cada una de las velocidades iniciales obtenidas con el control se encontró que sólo el catión Mn²⁺ activa significativamente a la enzima ($\alpha=0.014$).

Para los cationes Ca²⁺ y Na⁺, se encontró que la enzima se inhibía significativamente. Por otra parte, para los iones K⁺ y Mg²⁺ no se encontró diferencia significativa entre el control y las soluciones con los cationes mencionados. Los resultados anteriores fueron con base en el análisis de varianza y la prueba de Tukey ($\alpha=0.014$).

Como se puede observar en la tabla 5, la inhibición por el ion calcio encontrada para la β -glucosidasa de estudio, coincide para algunas lactasas convencionales como la de la levadura *Kluyveromyces lactis*, aunque para la lactasa de esta levadura la inhibición se presenta a una menor concentración (1mM) que la utilizada en este estudio (Dickson y col., 1979; Pivarnik y Rand, 1992). No se encontró reportada la inhibición por el ion sodio para otras lactasas pero si como activador para lactasas de *E. coli* y *S. thermophilus* (Mahoney, 1985; Smart y Richardson, 1987).

El efecto del ion magnesio encontrado para la β-glicosidasa de estudio coincide con lactasas de microorganismos como *Thermus aquaticus*, *Mucor pusillus* y *Paecilomyces varioti*, aunque frecuentemente este ion se encuentra como activador de las β-galactosidasas (Ulrich y col., 1972, Ismail y col, 1997; Kelly y col., 1988).

La activación de la β-glicosidasa por el ion manganeso es un efecto frecuente en un gran número de lactasa provenientes de *K. lactis*, *Torulopsis versatilis*, *Thermus aquaticus*, entre otros (Cavaille y Combes, 1995; Dickson y col., 1979, Mahoney y Whitaker, 1977, Ulrich y col., 1972).

5.10 INHIBICION POR PRODUCTOS DE REACCION

En la tabla 15 se muestran los resultados obtenidos de las diferentes velocidades iniciales a las tres diferentes concentraciones de trabajo.

TABLA 15. INHIBICION POR PRODUCTOS DE REACCION

| REACTIVO | V_o ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$) | REACTIVO | V_o ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$) |
|---------------------|--|-----------------------|--|
| Control | 48.55 | Control | 48.55 |
| Glucosa 5mM (0.1%) | 51.45 | Galactosa 5mM (0.1%) | 43.11 |
| Glucosa 10mM (0.2%) | 43.16 | Galactosa 10mM (0.2%) | 42.47 |
| Glucosa 15mM (0.3%) | 34.31 | Galactosa 15mM (0.3%) | 43.82 |

Al comparar la velocidad obtenida del control con respecto a las diferentes concentraciones de glucosa, se observó que a medida que aumentaba la concentración de glucosa, la actividad enzimática tendía a disminuir. Se encontró que a las diferentes concentraciones de galactosa y a las últimas dos concentraciones de glucosa la enzima se inhibe significativamente según análisis de varianza y la prueba de Tukey ($\alpha=0.0069$).

Para la lactasa de *Kluyveromyces lactis*, por ejemplo, se ha encontrado inhibición de glucosa y galactosa (42 mM). La lactasa de *S. fragilis* se inhibió con glucosa y galactosa 0.01M (Cavaille y Combes, 1995; Wendorf y Amudson, 1971), la galactosa inhibe a las

lactasas de *A. niger* y *S. thermophilus* (Papayannakos y Markas, 1993; Smart y Richardson, 1987).

Mientras la β -galactosidasa de *T. aquaticus* fue inhibida fuertemente por galactosa y más fuertemente por glucosa, la β -galactosidasa de *Thermoanaerobacter* incrementó su actividad con glucosa; para la galactosidasa de *S. solfataricus* no se ha reportado inhibición por glucosa o galactosa, y para la de *Cryptococcus laurentii* no se ha reportado inhibición por galactosa (Berger, 1997).

5.11 FORMACION DE OLIGOSACARIDOS

Dados los antecedentes de formación de oligosacáridos por carbohidrasas y particularmente β -galactosidasas y algunas extremozimas, se comprobó que también la β -glucosidasa de estudio formó oligosacáridos a los diferentes tiempos de hidrólisis de lactosa.

En la figura 19 se muestran los hidrolizados de lactosa al 5% a diferentes tiempos de reacción (30'-360'). Como puede observarse, a medida que pasa el tiempo la cantidad de lactosa hidrolizada es mayor, es decir, a medida que pasa el tiempo de reacción, la lactosa va desapareciendo gradualmente, siendo muy poco evidente su presencia al minuto 150 hasta desaparecer al minuto 360.

Como puede observarse, los azúcares de referencia glucosa, galactosa y lactosa tienen una separación considerable entre cada uno de ellos (sus Rf son diferentes: Gluc=0.69, Gal=0.61 y Lac=0.40) lo que permite identificar cada uno de estos azúcares en los diferentes tiempos de reacción. Así, se puede observar que la presencia de los principales productos de reacción (glucosa y galactosa) es muy clara desde el minuto 30 y que es cada vez más notable conforme avanza el tiempo de reacción, apareciendo en todos los tiempos de reacción del ensayo.

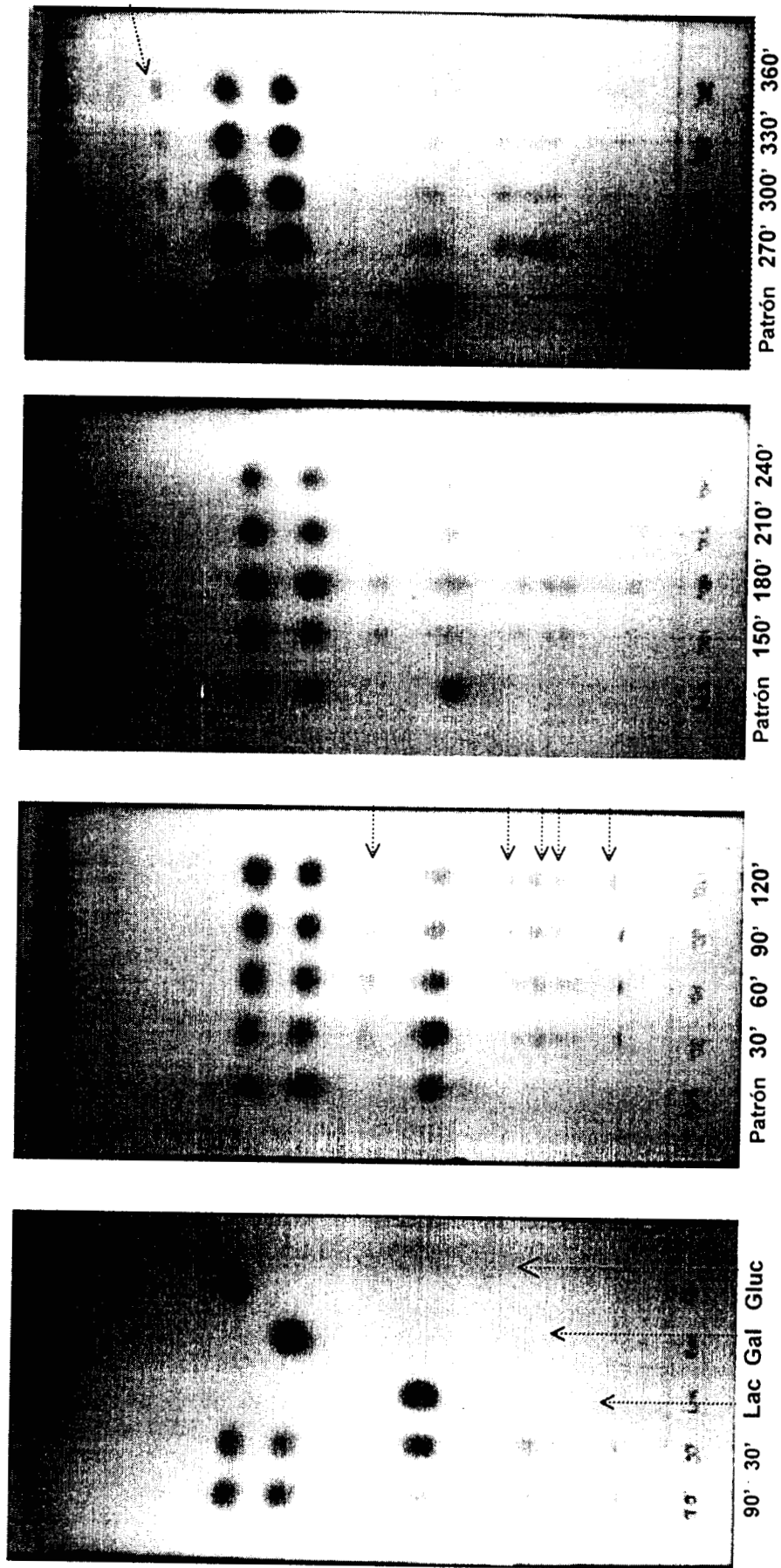
Desde los 30 minutos de reacción, hasta el minuto 240 se puede observar la aparición de cuatro diferentes manchas de cuatro posibles oligosacáridos con diferentes Rf (0.26, 0.22, 0.18 y 0.08), estos mismos empiezan a ser menos evidentes al minuto 270 para desaparecer casi completamente al minuto 360, lo mismo sucede con manchas que se observan con Rf de 0.47 (arriba de lactosa), sólo que estas empiezan a desaparecer al minuto 210. Por su comportamiento migratorio (Rf mayor a la lactosa), podría tratarse de un disacárido diferente a la lactosa, por la transferencia de un monosacárido a otro, a diferencia de los otros oligosacáridos, donde seguramente un monosacárido se transfiere a la lactosa para formar trisacáridos.

Manchas con Rf de 0.82 aparecieron de 270' a 360', estas probablemente correspondan a productos de la descomposición de azúcares (tipo furfurales) de bajo peso molecular y formados por los largos tiempos de reacción a altas temperaturas.

Aunque probablemente las manchas mencionadas en los párrafos anteriores no logren distinguirse perfectamente bien en la impresión presentada debido a la calidad de captura de las imágenes, cabe mencionar, que estas manchas son evidentes en las placas de cromatografía en capa fina utilizadas a los pocos minutos de haber sido reveladas.

Se ha detectado para otras lactasas que durante la hidrólisis de lactosa se pueden identificar hasta doce diferentes oligosacáridos, siendo la más abundante la alolactosa. La cantidad y naturaleza de los oligosacáridos depende del origen de la enzima, así como de algunas de las condiciones de reacción como concentración inicial de lactosa, tiempo de reacción, pH temperatura y iones orgánicos (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996).

FIGURA 18. HIDROLISIS DE LACTOSA A DIFERENTES TIEMPOS DE REACCION



Patrón = solución de glucosa 5% + galactosa 5% + lactosa 5%
Gluc = Glucosa, **Gal** = Galactosa, **Lac** = Lactosa

↑, <----- = Manchas identificadas

5.12 APLICACIÓN EN LECHE

La determinación de actividad de la β -glucosidasa se llevó a cabo mediante la determinación del aumento de glucosa liberada por la hidrólisis de lactosa en leche.

Se utilizaron tres clases de leche para esta determinación (Bronca, Alpura y Lala) con diferentes tratamientos térmicos (pasteurizada, ultrapasteurizada) o sin tratamiento térmico alguno (Bronca).

Los resultados para las diferentes muestras de leche, se muestran en la tabla 16; también se muestra el valor de velocidad inicial para lactosa al 5% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.6, utilizada como control.

TABLA 16. HIDROLISIS DE LACTOSA EN LECHE

| LECHE | Vo ($\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$) |
|--------------------------|---|
| Control | 48.55 |
| Bronca | 64.87 |
| Alpura pasteurizada | 93.62 |
| Alpura ultrapasteurizada | 99.02 |
| Lala pasteurizada | 75.98 |
| Lala ultrapasteurizada | 102.07 |

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que la actividad enzimática aumentó significativamente (de acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey, $\alpha=0.001$) a medida que aumentó el tratamiento térmico que recibió cada una de las leches utilizadas como sustrato; la actividad enzimática fue mayor para la leche que había sido ultrapasteurizada que para leche bronca.

En los resultados de la tabla 16 se puede también observar que respecto al control, todas las velocidades iniciales fueron mayores, es decir, aún cuando la leche no recibió ningún tratamiento térmico (leche bronca) la actividad enzimática fue mayor que para la lactosa en solución amortiguadora de fosfatos.

Pivarnik y Rand (1992), encontraron que la lactosa de *K. lactis* incrementa su actividad al sustituir el sustrato lactosa en solución amortiguadora por el sustrato leche, incrementando su actividad de 5.4 a 7.7 unidades (137%). Diferentes factores presentes en la leche y/o la influencia del tratamiento térmico podrían estar influyendo en la actividad de la enzima, por ejemplo, la presencia de proteínas, la precipitación del calcio por el tratamiento térmico, etc. Para poder aclarar este efecto se requiere realizar una investigación más profunda.

6. CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo la caracterización bioquímica de la β -glicosidasa de estudio determinando los siguientes parámetros: K_m , V_{max} , E_a , pH óptimo, peso molecular, influencia en la adición de: grupos sulfhidrilo, iones, galactosa y glucosa; formación de oligosacáridos, así como su estabilidad térmica.
- Los resultados presentados indican que la β -glicosidasa de estudio, puede ser usada para hidrolizar la lactosa en leche.
- La enzima encontraría aplicación en el tratamiento de leche y productos lácteos, aunque su pH óptimo (4.5) también la hace recomendable para su uso en la hidrólisis de lactosa en suero.
- La actividad de lactasa de la β -glicosidasa de estudio es mayor utilizando como sustrato a la leche en lugar de lactosa al 5% en solución amortiguadora, y también aumenta a medida que aumenta el tratamiento térmico de la leche.
- De acuerdo a los resultados obtenidos la β -glicosidasa de estudio es factible de ser utilizada en la hidrólisis de la leche a temperaturas de pasteurización y ultrapasteurización.

6.1 RECOMENDACIONES

✎ Llevar a cabo estudios para determinar si la enzima es segura para consumo humano. Esto es indispensable determinarlo para utilizarla en alimentos. Este sería el principal obstáculo para su utilización.

✎ Llevar a cabo pruebas de la utilidad de la enzima en la hidrólisis de la lactosa en leche a nivel de planta piloto, en las condiciones de proceso de pasteurización y ultrapasteurización.

7. BIBLIOGRAFIA

Adams, M.W.W., 1993, **Enzymes and proteins from organisms that grow and above 100°C**, Annu. Rev. Microbiol., 47:627-658.

Adams M. W. W. y Kelly R. M., 1995, **Enzymes from microorganisms in extreme environments**, Chem. Eng. News (C&EN), dic.18.

Adams, M.W.W., Perler F.B y Kelly R.M., 1995, **Extremozymes: Expanding the limits of Biocatalysis**, Bio/Technology, 13:662-668.

Aguilar A., 1996, **Extremophile research in the European union: from fundamental aspects to industrial expectations**, FEMS Microbiol. Rev., 18:89-92.

Alais, C., 1991, **Ciencia de la leche, principios de Técnica lechera**, CECSA, México, D.F.

Asp, N. G., Burvall, A., Hallgren, P. y Lundblad, A., 1980, **Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* Lactase (Maxilact[®]): part 2-Oligosaccharide structures**, Food Chem., 5:147-153

Badui, D. S., 1990, **Química de los alimentos**, Alhambra-Universitaria, México, D.F.

Baver, W.M., Bylina E.J., Swansen, R.Y., Kelly, R. M., 1996, **Comparison of a β -glucosidase and a β -manosidase from the hypertermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus***, J. Biotechnol. Chem., 271(39):23749-23755.

Berger J-L., Lee B. H., Lacroix Ch., 1997, **Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass β -galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus* YT-1**, Biotechnol. Appl. Biochem., 25:29-41.

Beveridge, T. y Toma, S.J., 1974, **Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent**, J. Food Sci., 39:49-51.

Bonekamp, F. J., y Oosterom, J., 1994, **On the safety of *Kluyveromyces lactis* -a review**, Appl. Environ. Microbiol., 41:1-3.

Brady, D., Marchant, R., McHale, L. y McHale, A. P., 1995, **Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media**, Enzyme Microb. Technol., 17:696-699.

Carbonaro, M., Bonomi, F., Iametti, S. y Carnovale, E., 1996, **Modifications in disulfide reactivity of milk induced by different pasteurization conditions**, J. Food Sci.; 61: 495-499.

Carrara C.R., Rubiolo A.C., 1996, **Determination of Kinetics Parameters for Free and Immobilized β -Galactosidase**, Process Biochem., 31: 243-248.

Casanueva, E. y Bourges R., 1995, **Los Nutrimientos**, en Nutriología Medica, Editorial Medica Panamericana Primera edición, México

Casas, L. T., Peña, C., Salvador, M., Frías, P., 1992, **Influence of spray drying on the permeability of *K. fragilis* measured by β -galactosidase activity**, Food Biotechnol., 6: 135-152.

Castillo, F. J., De Bales, S., Pedrique, M., Gómez, A. y Moreno, B., 1983, **Producción y caracterización de β -D-galactosidasa de levaduras**, Biotecnología de enzimas. 1er Simposio Interamericano. C. Huitrón (ed.), Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM México, pp 26-35.

Castillo, F. J., 1990, **Lactose metabolism by yeasts**, Yeast Biotechnology and Biocatalysis. H Verachtert y R de Mot (Eds.). Marcel Dekkers, Nueva York, pp. 297-320.

Cavaille, D. Y Combes, D., 1995, **Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis***, Biotechnol. Appl. Biochem., 22:55-64.

Champluvier, B., Kamp, B. Y Rouxhet, P. G., 1988, **Preparation and properties of β -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces sp.*** Enzyme Microb. Technol., 10:611-617.

Chang, B-Y. Y Mahoney, R. R., 1989, **Purification and thermostability of β -galactosidase (lactase) from an autolytic strain of *Streptococcus salivarius subs. Thermophilus***, J. Dairy Res., 56:117-127.

Chen, K.-Ch., Lee, T.-Ch., Houg, J-K., 1992 **Search method for the optimal medium for the production of lactase by *Kluyveromyces fragilis***, Enzyme Microb. Technol., 14:659-664.

Choi Y. J., Kim I. H., Lee B. Y. Y Lee J. S., 1995, **Purification and characterization of β -galactosidase from alkalophilic and thermophilic *Bacillus sp. TA-11***, Biotechnol. Appl. Biochem., 22:191-201.

D'Auria, S., Barone, R., Rossi, M., Nucci, R., Barone, G., Fessas, D., Bertoli, E. y Tanfani, F., 1997, **Effects of temperature and SDS on the structure of β -glycosidase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus***, Biochem. J., 323:833-840.

De Bales, S. A. y Castillo, F. J., 1979, **Production of Lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey**, Appl. Environ. Microbiol., 37:1201-1205.

Dickson R. C. y Markin J. S., 1980, **Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis***, J. Bacteriol., 142: 777-785.

Dickson, R. C, Dickson, L. R. Y Markin, J. S., 1979, **Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis***, J. Bacteriol., 137: 51-61.

Duffaud, G. D. y McCutchen, C. M., 1997, **Purification and characterization of extremely thermostable β -mannanase, β -mannosidase, and α -galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotogata neapolitana* 5068**, Appl. Environ. Microbiol., 63: 169-177.

Dziezak, J. D., 1991, **Enzymes: Catalysts for food processes**, Food Technol., 45(1):78-85.

Fennema, O., 1985, **Introducción a la Ciencia de los Alimentos**, edit. Reverté, S.A de C.V, Barcelona, España.

García-Garibay, M., 1986., **Yogurt. Aspectos microbiológicos y de elaboración**, Tecnol. Aliment., 21:5-14

García-Garibay M., 1992, **Recuperación de enzimas intracelulares de interés industrial**, Ciencia, 43:23-33.

García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Revah Moissev S., 1993, Cap. 6: Productos lácteos, en **Biotecnología Alimentaria**, editores: García-Garibay Mariano, Quintero Ramírez Rodolfo y López Munguía Agustín , Limusa, México, D.F

García-Garibay, M. y Gómez-Ruiz, L., 1996, **Usos de β -galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos**, Rev. Invest. Clin., Suplemento 48:51-61.

Gekas, V. Y López-Leiva M., 1985, **Hydrolysis of lactose: A literature review**, Proces Biochem., 20:2-12.

Godfrey, T y West S., 1996, Industrial enzymology, editores: Godfrey, Ty West S., Stockton Press, London

Halder, J y Bhaduri A., 1997, **Glycosidases from tea-leaf (*Camellia sinensis*) and characterization of β -galactosidase", J. Nutr. Biochem., 8:378-384.**

Halio S. B., Blumental I. I., Short S. A., Merrill B. M. Kelly R. M., 1996, **Sequence, Expression in *Escherichia coli*, and Analysis of the Gene encoding a novel intracellular protease (PfpI) from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus***, J. Bacteriol., 178:2605-2612.

Herber, R. A, 1992; **A perspective on the biotechnological potential of extremophiles**, Elsevier Sci. Pub., 10:395-402

Holsinger V. H. Y Kligerman A. E., 1991, **Applications of lactase in dairy foods and other foods containing lactose**, Food Technol., 45(1):92-95.

Ismail, S. A., Mabrouk, S. S., Mahoney, R.R., 1997, **Purification and characterization of β -galactosidase from *Mucor pusillus***, J. Food Biochem., 21:145-162.

Itoh, T., Susuky, M., Addachi, S., 1982, **Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeasts**, Agric. Biol. Chem., 46:899-904.

Jackson, E. H. Y Jellen, P., 1989, **Comparison of acid and neutral lactase's for batch hydrolysis of lactose in whey**, Milchwissenschaft, 44(9) 544-546.

Jiménez-Guzmán J., 1996, **Efecto del tratamiento termico de la leche sobre la actividad de lactasa**, Tesis de maestria, UAM-Iztapalapa, México D.F.

Kelly, C. T., O'Mahony, M. R., Fogarty W.M., 1988, **A novel thermostable extracellular β -galactosidase of *Paecilomyces varioti***, Appl. Microbiol. Biotechnol., 27:383-388.

Kelly M.R y Adams W.W.M., 1994, **Metabolism in hypertermophilic microorganism**, Antonie Van Leeuwenhoek, 66:247-270.

Kengen S. W. M., Luesink E.J., Stams A.J.M y Zehender A.J.B., 1993, **Purification and characterization of an extremely thermostable β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus***, Eur. J. Biochem., 213: 305-312.

Ku, M. A. y Hang, D., 1992, **Production of yeast lactase from sauerkraut brine**, Biotechnol. Lett., 14:925-928.

Lisker, R. 1996, **Herencia de la mala digestión de lactosa**, Rev. Invest. Clin., Suplemento 48:23-24.

López, P., Rosado, L. J., Palma, M., González, C. Y Valencia, M. E., 1996, **Mala digestión de lactosa. Su definición, su prevalencia en México y sus implicaciones en el consumo de leche**, Rev. Invest. Clin., Suplemento 48:15-22.

Ludlow J. M. y Clarck D.S., 1991, **Engineering considerations for the applications of extremophiles in Biotechnology**, Crit. Rev. Biotechnol., 10: 321-345.

Madigan M. y Marris B. L ., 1997, **Extremophiles.**, Sci. Am., Abril 66-71.

Mahoney, R. R., 1980, **Number and nature of the sulphhydryl groups of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis***, J. Food Biochem., 4:189-199.

Mahoney, R. R., 1985, **Modification of lactose and lactose containing dairy products with β -galactosidase**, en Developments in Dairy Chemistry-3 Edited by P.F Fox.

Mahoney, R.R. y Whitaker, J. R., 1977, **Stability and enzymatic properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis***, J. Food Biochem., 1:327-350.

Mahoney, R. R. y Whitaker, J.R., 1978, **Purification and physicochemical properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis***, J. Food Sci., 43:584-591.

Moracci M., Nucci R., Febbraio F., Vaccaro C., Vespa Nunzia. La Cara G., Vaccaro C., Rossi Mosé. 1997, **Expression and extensive characterization of a β glycosidase from the extreme thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* in *Escherichia coli*: Authenticity of the recombinat enzyme**, Enzyme Microb. Techonol., 17: 1992-1997.

Mozaffar, Z., Nakanishi, K., Matsuno, R. y Kamikuko, T., 1984, **Purification and properties of β -galactosidases from *Bacillus circulans***, Agric. Biol. Chem., 48: 3053-3061,

Nogodawithana, T. Y Reed, G., 1993, **Enzymes in Food Processing**, 3^a. Ed., Academic Press, Inc. San Diego, California.

Nijpels, H. H., 1981, **Lactases and their applications**, en Birch GG, Blakebroug N, Parker K J, eds. Enzymes and Food processing. London: Applied Science Pub, pp. 89-103.

Palma, M., Rosado, L. J., López, P. y Valencia, M.E., 1996, **Intolerancia a la lactosa. Su definición, su prevalencia en México y sus implicaciones en el consumo de leche**, Rev. Invest. Clin., Suplemento 48:25-31.

Papayannakos, N. y Markas, G., 1993, **Studies on modelling and simulation of lactose hydrolysis by free and immobilized β -galactosidase from *Aspergillus niger***, Chem. Eng. J., 52:B1-B12.

Pérez-Gavilán, J. y Pérez-Gavilán P., 1984, **Bioquímica y Microbiología de la Leche**, Limusa, S.A, México, D.F.

Pivarnik, L. F. y Rand, A. G., 1992, **Assay Conditions effect on β -galactosidase activity from *Kluyveromyces lactis***, J. Food Sci., 57:1020-1021.

Querol, E., Perez-Pons, J y Mozo-Villarias A., 1996, **Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability**, Protein Eng., 9:265-271.

Robertson D. E., Mathur E. J., Swason R. V., Marrs B. L. Y Short J. M., 1996, **The discovery of new biocatalysts from microbial diversity**, SIM News, 46:1-8.

Rosado, L. J., 1996a **Importancia del estado nutricional en la capacidad de digestión y tolerancia a la lactosa**, Rev. Invest. Clin., Suplemento 48:45-50.

Rosado, L. J., 1996b, **El yogurt como fuente de autodigestión de lactosa**, Rev. Invest. Clin., Suplemento 48:63-66.

Rosado, L. J. y Lisker, R., 1996, **Implicaciones de la mala digestión y de la intolerancia a la lactosa en la salud pública**, Rev. Invest. Clin., Suplemento 48:87-88.

Rosado, L. J. y Mimiaga, C., 1996, **Fórmulas libres de lactosa disponibles en México. Su importancia y aplicaciones**, Rev. Invest. Clin., Suplemento 48:67-86.

Sánchez, F. L. y Castillo, F.J., 1980, **Producción, extracción y caracterización parcial de β -D-galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* crecida en suero de leche**, Acta Cient. Venezolana , 31:154-159.

Shibuya, H., Kobayashi, H., Sato, T., Kim, W-S., Yoshida, S., Kaneko, S., Kasamo, S. y Kusakabe, I., 1997, **Purification, characterization and cDNA of a novel α -galactosidase from *Mortierella vinacea***, Biosci. Biotechnol. Biochem., 61:592-598.

Smart, J. y Richardson, B., 1987, **Molecular properties and sensitivity to cations of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* with four enzyme substrates**, Appl. Microbiol. Biotechnol., 26:177-185.

Solomons, N. W., 1996, **La lactosa y sus implicaciones en la gastroenterología. La nutriología y la ciencia de los alimentos**, Rev. Invest. Clin., Suplemento 48:1-13.

Sthal, E., 1969, **Thin Layer Chromatography and Laboratory**, Pringer-Verlag, Alemania, pp. 812-869.

Thomáska M., Stredanský M., Gemeiner P, y Sturdík E., 1995, **Improvement of the Thermostability of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus***, Process Biochem., 30: 649-652.

Ulrich, J. T., Mcfeters, G. A. y Temple, K.L., 1972, **Induction and characterization of β -galactosidase in an extreme thermophile**, J. Bacteriol., 110:691-698.

Vega, F. L., 1983, **Temas cotidianos sobre alimentación y nutrición en la infancia**, México, Ed. Francisco Méndez Cervantes, 63-72

Vega, F. L., 1996, **Deficiencia secundaria de lactasa en niños y sus implicaciones y sus implicaciones epidemiológicas**, Rev Invest. Clin., Suplemento 48:33-43.

Voet, D. y Voet J., 1995, **Biochemistry** , Second Edition John Wiley & Sons Inc., New York.

Wendorff, W. L. y Amudson, C. H., 1971, **Characterization of beta-galactosidase from *Sacharomyces fragilis***, J. Milk Food Technol., 34:300-306.

Whitaker, J., 1994, **Principles of Enzymology for the Food Science**, Second Edition, edit Marcel Dekker, Inc., New York, New York.

TESIS URGENTES

*** ZARAGOZA ***

Ofset • Libros • Folletos • Masters

CALZADA I. ZARAGOZA N° 574 LOCAL " E "

A TRES CALLES DEL METRO ZARAGOZA

COL. FEDERAL MEXICO, D.F.

ROBERTO MOYA AHUMADA

PRESUPUESTOS

TELEFONO 521 - 98 - 00