

Empleo de una β -galactosidasa comercial de *Kluyveromyces lactis* en la hidrólisis de lactosuero

Usage of a commercial β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in the hydrolysis of whey

Laura Julliet Beltran F.*, Alejandro Acosta C.*

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El lactosuero es el mayor subproducto de desecho de la industria láctea. Por sus elevados valores de DBO se considera un foco de contaminación de aguas y suelo cuando se descarta sin ningún tratamiento. Una alternativa para la disposición final de este residuo agroindustrial, es su utilización como medio de cultivo para varios procesos fermentativos, después de una hidrólisis enzimática, de esta manera garantizar una mayor disponibilidad de azúcares fermentables, para su posterior aplicación en biotecnología, medio ambiente y/o alimentos.

OBJETIVO

Evaluar los efectos del pH, temperatura y concentración de la enzima sobre lactosuero empleando una β -galactosidasa comercial de *Kluyveromyces lactis* y determinar los parámetros cinéticos de la enzima.

MATERIALES Y MÉTODOS

La hidrólisis de la lactosa se desarrolló tanto en soluciones tamponadas de lactosa como en lactosuero, se evaluaron 5 niveles para el pH (4,5 - 8,5), temperatura (25°C-65°C) y concentración de enzima (0,025 g/L - 0,5 g/L), todos los experimentos se realizaron por triplicado en matraz de 100 mL y los datos fueron analizados empleando el software GraphPad Prism.

RESULTADOS

A un pH de 6,5 y una temperatura de 45°C, se alcanzaron las mejores condiciones de hidrólisis del lactosuero. De acuerdo a los resultados cinéticos, la enzima presentó inhibición competitiva por galactosa con un K_m igual a $8,01 \times 10^{-2} M$, K_i de $6,85 \times 10^{-2} M$ y V_{max} de $1,86 \times 10^{-2} \text{ mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

CONCLUSIÓN

Las mejores condiciones de temperatura y pH fueron de 6,5°C y 45°C respectivamente, se alcanzó un 100% de hidrólisis en una hora con 0,1 g/L de enzima. Además, se evidenció que la velocidad de reacción de la enzima fue inhibida por galactosa.

PALABRAS CLAVES

Hidrólisis enzimática, lactosuero, β -galactosidasa, parámetros cinéticos, *Kluyveromyces lactis*.

*Grupo de Biotransformación - Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Contacto: lan_bel18@hotmail.com
Recepción: 03-26-2013. Aceptación: 08-27-2013.

ABSTRACT

INTRODUCTION

The whey is the largest waste subproduct of the dairy industry. Due to its high values of BOD is considered a source of water and soil contamination when discarded without any treatment. An alternative for the disposal of this agroindustrial waste is its application as a culture medium for various fermentation processes after an enzymatic hydrolysis thus ensuring a greater availability of fermentable sugars for subsequent application in biotechnology, environment and / or food.

OBJECTIVE

To evaluate the effects of pH, temperature and enzyme concentration on whey using a commercial β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, and determine the kinetic parameters of the enzyme.

MATERIALS AND METHODS

The hydrolysis of lactose was performed in buffered solutions of lactose and in whey as well, 5 levels were evaluated for pH (4.5-8.5), temperature (25°C-65°C) and enzyme concentration (0.025 g/L to 0.5 g/L), all the experiments were performed in triplicate in Erlenmeyer flask (100 mL) and analyzed using the GraphPad Prism software.

RESULTS

We found that the best conditions of pH and temperature for the whey hydrolysis were at 6,5°C and 45°C respectively. According to the kinetic results, the enzyme presented competitive inhibition for galactose with a K_m equal to 8.01×10^{-2} M, K_i of 6.85×10^{-2} M and V_{max} of 1.86×10^{-2} molmg⁻¹min⁻¹.

CONCLUSIONS

The best conditions of pH and temperature were 6.5°C and 45°C respectively, a 100% of hydrolysis was achieved in one hour with 0.1 g/L of enzyme. Furthermore, it was shown that the reaction rate of the enzyme is inhibited by galactose.

KEY WORDS

Enzymatic hydrolysis, lactose, β -galactosidase, kinetic parameters, *Kluyveromyces lactis*.

INTRODUCCIÓN

La industria láctea genera cantidades significativas de residuos líquidos, mayormente lactosuero. Se estima que a partir de 10 litros de leche de vaca se puede producir de 1 a 2 kg de queso y un promedio de 8 a 9 kg de suero. Al representar cerca del 90% del volumen de la leche, contiene la mayor parte de los compuestos hidrosolubles, incluyendo el 95% de la lactosa.¹

Los elevados valores de DBO del lactosuero, están en un rango de 30-60 kg/m³, resultante de sus altos contenidos de lactosa² aumentando considerablemente la carga contaminante del vertido final.¹ En Colombia, se presenta una gran proporción de estos vertidos debido a la baja tecnificación que se tiene en la producción de derivados lácteos. Por ejemplo, solo en el oriente de Antioquia registrados en la Cámara de Comercio del Oriente Antioqueño, se tiene conocimiento de 11 empresas pertenecientes al sector lácteo, donde dos de ellas productoras de queso requieren 30.000 litros/día de leche, por lo tanto se pueden estar produciendo unos 27.000 litros/día de suero. Diferentes aplicaciones para el lactosuero han sido desarrolladas en un esfuerzo por solucionar el problema de su disposición. Una alternativa es el uso de lactosuero como sustrato para varios procesos fermentativos incluyendo la producción de etanol, metanol, proteína de levadura, goma xantano³ o ácidos orgánicos tales como lactato, propionato o acetato.⁴

Sin embargo, la lactosa es uno de los azúcares más difícilmente fermentados, el número de microorganismos fermentadores es limitado y el uso de microorganismos genéticamente modificados para su bioconversión incrementa los costos del proceso.⁵ Su hidrólisis da como resultado sus monosacáridos constituyentes: glucosa y galactosa, facilitando así sus procesos fermentativos.⁶

La hidrólisis de la lactosa se puede obtener por medio de tratamiento ácido o enzimático. El primer método, se caracteriza por el uso de ácidos concentrados y altas temperaturas (150°C);⁷ los productos de la hidrólisis, (glucosa y galactosa) no son generados en cantidades equimolares, pero un número de subproductos indeseados también se forma.² El segundo método, emplea enzimas bajo condiciones de temperaturas moderadas y pH específicos, no desnaturaliza

la proteína del lactosuero, no produce color marrón en la solución, y no genera subproductos indeseados.⁸

Hay varias fuentes de β-galactosidasas, no todas son aceptadas o recomendadas como seguras. La lactasa de *Escherichia coli*, aunque sea una especie bastante estudiada, no se utiliza en el procesamiento de alimentos debido a su alto costo y provoca problemas de toxicidad cuando se usan extractos crudos de coliformes. Las producidas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Kluyveromyces* sp., (*lactis* o *fragilis*) son consideradas fuentes seguras de utilización.^{9,10} Generalmente, las preparaciones comerciales de lactasas de origen fúngico, especialmente *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, son de gran importancia, cuando las condiciones de operación están en un rango de pH ácido (2,5-4,5), siendo apropiadas para la hidrólisis del suero ácido. Las β-galactosidasas provenientes de levaduras, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus*, tienen un pH óptimo concentrado en la región neutra, son bien aceptadas para la hidrólisis de la lactosa de la leche y del suero dulce. Entre tanto, estas últimas son fuertemente inhibidas por alta concentración de calcio en la leche y pequeñas concentraciones de sodio. Son también inhibidas por la presencia de galactosa y glucosa.^{11,12} Presentan temperatura óptima

de actividad entre 30°C y 40°C, lo que representa una desventaja, pues facilita la contaminación microbiana, siendo aconsejable, un periodo corto de hidrólisis, de 2 a 3 horas.¹³

Un proceso eficiente y económicamente viable de la hidrólisis de la lactosa del suero depende del costo de la producción de la enzima en combinación con una cinética favorable y las propiedades de estabilidad. La cinética determina los factores que afectan la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Los factores más importantes son: la concentración de enzima, la concentración de sustratos, inhibidores y activadores, pH, fuerza iónica y temperatura. El análisis de estos factores es importante en el conocimiento de la naturaleza de la reacción enzimática.² Varios autores han modelado la hidrólisis de la lactosa usando enzimas de varias fuentes. Las ecuaciones y mecanismos enzimáticos para estos modelos cinéticos se describen en la **Tabla 1**. Dependiendo de la fuente de la enzima ésta seguirá un modelo cinético específico.

En este trabajo, se evaluó el efecto de la temperatura, el pH y la concentración de enzima sobre la actividad de β-galactosidasa de *K. lactis*. Se ajustaron cuatro modelos diferentes de la hidrólisis de la lactosa

Tabla 1. Modelos enzimáticos considerados para la determinación de los parámetros cinéticos.

Modelo cinético	Mecanismo enzimático	Ecuación
1 Michaelis-Menten sin inhibición.	$E+S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E+P$	$V = \frac{V_{max} C_s}{K_m + C_s}$
2 Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto.	$E+S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E+P \quad E+P \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_3} EP$	$V = \frac{V_{max} C_s}{K_m \left(1 + \frac{C_p}{K_i}\right) + C_s}$
3 Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por producto.	$E+S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E+P \quad ES+P \xrightleftharpoons[k_{-4}]{k_4} ESP$	$V = \frac{V_{max} C_s}{K_m + C_s \left(1 + \frac{C_p}{K_i}\right)}$
4 Michaelis-Menten con inhibición no-competitiva por producto.	$E+S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E+P \quad E+P \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_3} EP \quad ES+P \xrightleftharpoons[k_{-4}]{k_4} ESP$	$V = \frac{V_{max} C_s}{K_m \left(1 + \frac{C_p}{K_i}\right) + C_s \left(1 + \frac{C_p}{K_i}\right)}$

Tomado y modificado de: ^[20]

basados en diferentes mecanismos enzimáticos para determinar los parámetros cinéticos de la enzima. Se estudiaron diferentes concentraciones de galactosa para analizar efectos inhibitorios por producto y la discriminación de los modelos cinéticos se hizo mediante criterios estadísticos.^{14,15}

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

La enzima, GODO-YNL2 es un extracto enzimático de *K. lactis* suplido por Godo Shusei Co., Ltd. (Tokio, Japón). Algunas características de la enzima son mostradas en la **Tabla 2**. La lactosa y la galactosa de las soluciones tamponadas son grado reactivo. Se usó una buffer BM (Buffer Milk)⁸ con una composición de sales similar a las sales en el lactosuero y un pH de 6,5, su composición se muestra en la **Tabla 3**. El lactosuero concentrado (permeado de lactosuero) fue suministrado por COLANTA[®] (Medellín, Colombia), se pasteurizó a 72°C y luego se analizó la concentración de lactosa, glucosa, galactosa y ácido láctico, por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleando una cromatógrafo AGILENT TECHNOLOGIES 1200 con una columna de intercambio iónico AMINEX HPX-87H (300x7,8 mm), se empleó como fase móvil H₂SO₄ 0,008N, un flujo de 0,6 mL/min, la temperatura de la columna fue 35°C utilizando Detector de Índice de Refracción AGILENT TECHNOLOGIES. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.¹⁶ Se realizó un análisis microbiológico de mesófilos en medio PCA (Plate Count Agar) según el método

Tabla 2. Características del extracto enzimático de *Kluyveromyces lactis* GODO-YNL2.

Parámetro	Característica
Presentación.	Líquida color ámbar.
Concentración de proteína.*	46,52 g/L
Densidad.	1,1 g/cm ³
Actividad.	50000 GU/g

*Valor determinado experimentalmente.

oficial AOAC 966.23¹⁷ y mohos y levaduras en medio OGY (Oxytetracycline-Glucose-Yeast) suplementado con gentamicina según el método oficial AOAC 997.02.¹⁷ En la **Tabla 4**, se muestran las características del lactosuero empleado.

Tabla 3. Composición de la buffer BM.

Componente	mM
Citrato de Na ₃ .2H ₂ O	2,70
Ácido cítrico. H ₂ O	7,91
K ₂ SO ₄	1,03
K ₂ HPO ₄	2,99
KH ₂ PO ₄	10,80
KOH	14,93
MgCl ₂ .6H ₂ O	4,08
CaCl ₂ .6H ₂ O	5,10
Solución 4N de NaOH	2,5
NaHCO ₃	10,00
NaNO ₂	48,27

Tomado de:^[8]

Tabla 4. Características fisicoquímicas y microbiológicas del lactosuero concentrado después de pasteurizado.

Componente	Concentración o valor
Lactosa.	128 g/L
Glucosa.	2,55 g/L
Galactosa.	2,67 g/L
Proteína.	4,2 g/L
Ácido láctico.	2,56 g/L
pH.	5,7
Microorganismos mesófilos.	38x10 ³ UFC/g
Mohos y levaduras.	59x10 ³ UFC/g

Fuente: datos experimentales.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA, EL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado en Erlenmeyers de 100 mL con un volumen de 50 mL, situados en un shaker (agitador orbital) con control de pH y temperatura. Se tomó muestra de 1 mL cada minuto hasta finalizar la hidrólisis y la reacción fue detenida mezclando la muestra con 1 mL de H_2SO_4 0,5 N.

La hidrólisis de la lactosa fue llevada a cabo, tanto en soluciones tamponadas de 128 g/L de lactosa como en lactosuero concentrado pasteurizado, a temperaturas entre 25°C-65°C ajustando el pH a 6,5 con NaOH 4N, y pH entre 4,5-8,5 fijando la temperatura en 45°C. El efecto de la concentración de enzima se evaluó empleando lactosuero como sustrato y probando concentraciones de enzima entre 0,025 g/L-0,5 g/L a pH 6,5°C y 45°C. La producción de glucosa en el tiempo fue analizada por el método GOD-PAD¹⁸ empleando un espectrofotómetro UV visible GENESYS 20 y la actividad enzimática fue determinada según el método de velocidades catalíticas iniciales.¹⁹

AJUSTE DE LOS MODELOS CINÉTICOS

Los ensayos fueron realizados en soluciones tamponadas con concentraciones de lactosa en un rango de 16-128 g/L, concentraciones de galactosa en un rango de 0-15 g/L, pH 6,5, temperatura de 45°C y concentración de enzima de 0,1 g/L. La toma de muestra, concentración de glucosa y determinación de la actividad enzimática se realizó como se describió anteriormente. Los modelos cinéticos ajustados se muestran en la [Tabla 1](#).

Los datos fueron ajustados a través de un análisis de regresión no-lineal empleando GraphPad Prism 5 (Software libre).

RESULTADOS

EFFECTO DE LA TEMPERATURA, EL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El estudio del efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de la enzima fue necesario, no solo para determinar las condiciones de máxima actividad enzimática, sino también para eliminar la inactivación de la enzima debido a estas dos variables al hacer los estudios cinéticos.

El efecto del pH sobre la actividad enzimática es mostrado en la [Figura 1](#), donde se graficó actividad específica vs. pH. Como se puede observar, el pH de máxima actividad enzimática fue de 6,5; usando tanto lactosuero como soluciones de lactosa como sustrato. La enzima fue un poco más activa en lactosuero que en la solución tamponada (BM) de lactosa.

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática es representado en la [Figura 2](#), donde se graficó Actividad específica vs. Temperatura. Los resultados mostraron que la temperatura de máxima actividad enzimática fue de 45°C igual que en el caso del pH, la enzima es más activa en lactosuero que en las soluciones tamponadas de lactosa.

El efecto de la concentración de enzima sobre la actividad se representa en la [Figura 3](#), donde se graficó el Porcentaje de sustrato hidrolizado vs. Tiempo.

Teniendo en cuenta los modelos cinéticos de la [Tabla 1](#), donde hay una tendencia lineal de la velocidad de hidrólisis con la concentración de enzima, se corroboró la tendencia de los resultados esperados, donde la velocidad de hidrólisis aumentó con la concentración de enzima, por lo tanto, la hidrólisis total del sustrato se alcanzó más rápidamente al aumentar la concentración de enzima en el proceso. Según los resultados, la concentración mínima de enzima a utili-

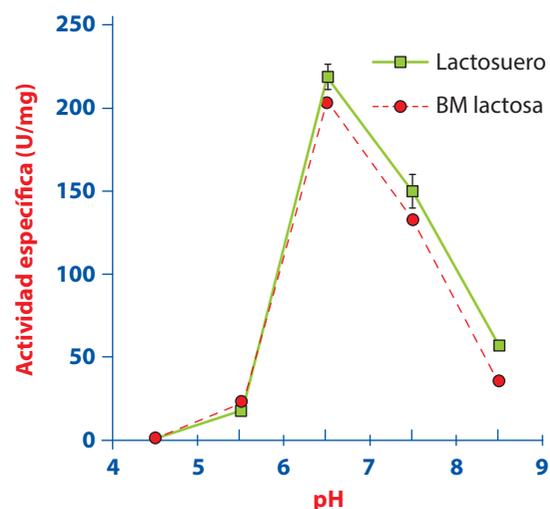


Figura 1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* GODO-YNL2 a 45°C empleando una concentración de lactosa de 128 g/L.

zar es de 0,1 g/L, se obtuvo un porcentaje de sustrato hidrolizado del 100% en una hora, al igual que las concentraciones superiores.

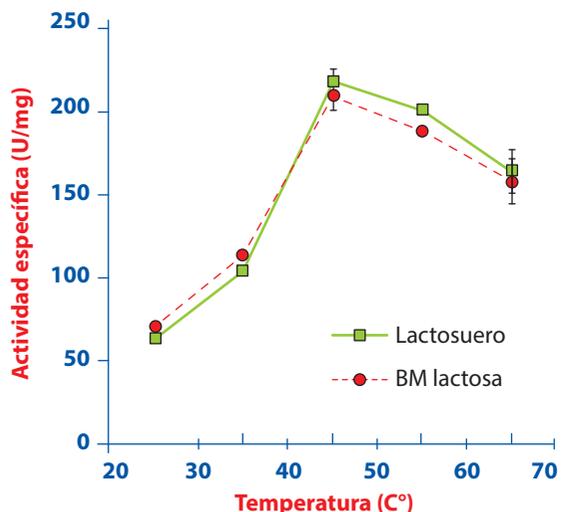


Figura 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* GODO-YNL2 a pH 6,5 empleando una concentración de lactosa de 128 g/L.

Se podría alcanzar una mayor velocidad de hidrólisis con concentraciones más altas de enzima, pero la diferencia no es significativa. Concentraciones de enzima por debajo de 0,05 g/L requerirán tiempos de hidrólisis mayores de 2 horas para alcanzar la transformación total del sustrato.

PARÁMETROS CINÉTICOS

Los modelos cinéticos considerados en la **Tabla 1**, con galactosa como el producto inhibidor (modelos 2, 3 y 4) y evaluados a pH 6,5°C y 45°C son presentados en **Tabla 5**, estos son el resultado de graficar la velocidad de hidrólisis (V) vs. Concentración de sustrato (S) para cada concentración de galactosa estudiada. La técnica matemática de ajuste fue regresión no lineal. Como se puede observar en la **Tabla 5**, para los modelos 1 y 2, el valor de V_{max} y K_m son similares, (Modelo 1. V_{max} : $1,87 \times 10^{-2} \text{ molmg}^{-1}\text{min}^{-1}$ y K_m : $8,09 \times 10^{-2} \text{ M}$, Modelo 2. V_{max} : $1,86 \times 10^{-2} \text{ molmg}^{-1}\text{min}^{-1}$ y K_m : $8,01 \times 10^{-2} \text{ M}$), al igual que el grado de ajuste (0,973 y 0,9746 modelo 1 y 2 respectivamente). En comparación con los modelos 3 y 4, los modelos 1 y 2 se ajustaron mejor, teniendo el modelo 2 el mayor grado de ajuste

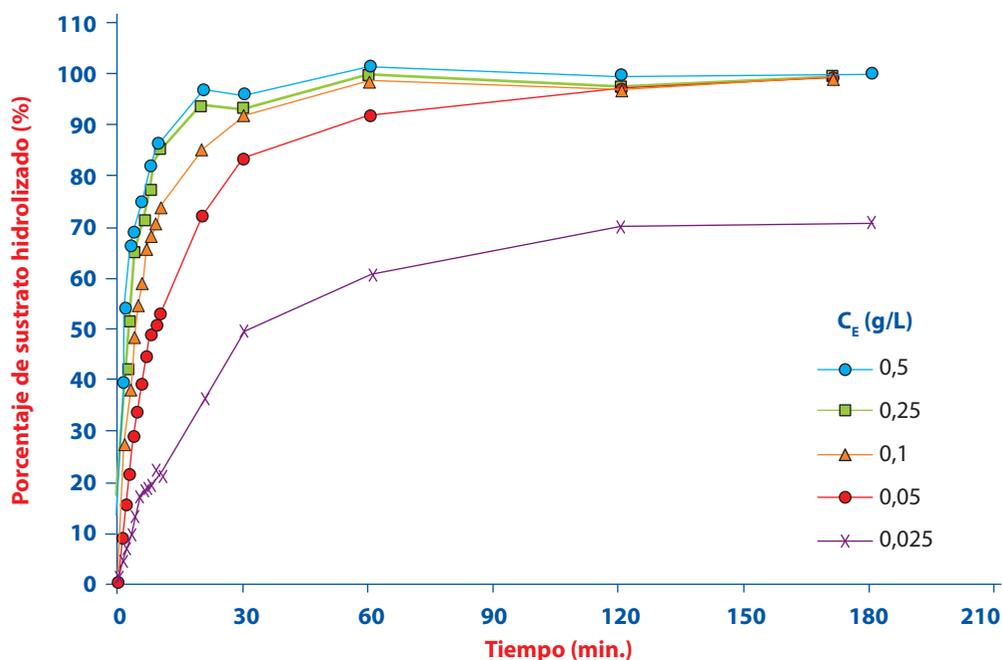


Figura 3. Efecto de la concentración de enzima sobre el porcentaje de sustrato hidrolizado por unidad de tiempo empleando lactosuero como sustrato a 45°C y pH = 6,5.

Tabla 5. Parámetros cinéticos obtenidos con cada modelo ajustado.

Modelo	Parámetros	Valor
1	V_{max}	$1,87 \times 10^{-2} \pm 4,32 \times 10^{-4}$
	K_m	$8,09 \times 10^{-2} \pm 6,01 \times 10^{-3}$
	R^2	0,9730
2	V_{max}	$1,86 \times 10^{-2} \pm 3,36 \times 10^{-4}$
	K_m	$8,01 \times 10^{-2} \pm 4,88 \times 10^{-3}$
	K_i	$6,85 \times 10^{-2} \pm 5,25 \times 10^{-3}$
	R^2	0,9746
3	V_{max}	$2,12 \times 10^{-2} \pm 6,98 \times 10^{-4}$
	K_m	$1,23 \times 10^{-1} \pm 9,93 \times 10^{-3}$
	K_i	$1,68 \times 10^{-1} \pm 1,68 \times 10^{-2}$
	R^2	0,9428
4	V_{max}	$2,04 \times 10^{-2} \pm 4,79 \times 10^{-4}$
	K_m	$1,08 \times 10^{-1} \pm 6,77 \times 10^{-3}$
	K_i	$2,48 \times 10^{-1} \pm 1,79 \times 10^{-2}$
	R^2	0,9617

de todos los modelos evaluados. Pero al tener el R^2 , valores con diferencias tan poco significativas, se hace necesario linealizar la gráfica de Sustrato vs. Velocidad calculando el inverso de ambas variables, y graficando $1/S$ vs. $1/V$, a esto se le conoce como linealización de Lineweaver-Burk.²⁰ Mediante este procedimiento se evidenció con mayor certeza el tipo de inhibición que presenta la enzima.

Los resultados de la linealización se muestran en la Figura 4, en ella se observa, que se trata de una inhibición competitiva por producto, es decir, la enzima se comporta según el modelo 2, el cual tuvo el mayor grado de ajuste. Esto se dedujo porque las líneas correspondientes a las corridas realizadas sin galactosa y con galactosa convergen en un mismo intercepto, aunque el producto inhibidor (galactosa) redujo la velocidad de reacción, la V_{max} siguió siendo la misma, lo cual es típico de un comportamiento inhibitorio competitivo.

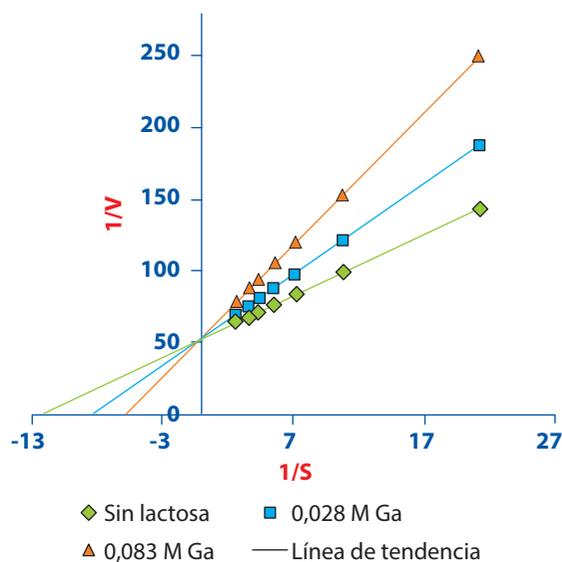


Figura 4. Linealización de Lineweaver-Burk.

Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos con la linealización de Lineweaver-Burk.

Parámetro	Valor
V_{max}	$0,0186 \text{ molmg}^{-1}\text{min}^{-1}$
K_m	0,08 M
$K_{mapp(0,028 \text{ M Ga})}$	0,118 M
$K_{mapp(0,083 \text{ M Ga})}$	0,172 M
K_i	6,92 M

Con la ecuación de la Figura 4, se calcularon los parámetros V_{max} y K_m para comprobar que sus valores son similares a los calculados sin linealización de las curvas, y se comprobó que son similares, como se muestra en la Tabla 6.

En la Tabla 6, se presenta el parámetro K_{mapp} , el cual aumentó con la concentración de galactosa, esto es típico de un caso de inhibición competitiva.

DISCUSIÓN

Son muchas las variables que inciden de manera significativa en la actividad de las enzimas sobre un sustrato,

siendo el pH y la temperatura las de mayor relevancia, estas dos variables presentaron un comportamiento muy similar, formando una campana al graficarlas con respecto a la actividad de la enzima como respuesta en un intervalo determinado, donde la mayor actividad correspondió al pico de la campana característica que se reprodujo con los resultados de las Figuras 1 y 2 evaluadas con una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* GODO-YNL2 sobre lactosuero y soluciones de lactosa. Esta β -galactosidasa fue considerada mesofílica, con una actividad máxima a una temperatura de 45°C aproximadamente, y pH óptimo cercano a 6,5.

La diversidad de β -galactosidasas es considerable y sus propiedades varían de una fuente a otra. La literatura reporta β -galactosidasas de microorganismos mesófilos con temperaturas óptimas más bajas, como se muestra en la Tabla 7.

Los valores resultantes del estudio de la actividad enzimática bajo diferentes condiciones, varían dependiendo del sustrato empleado. Algunos autores emplean sustratos cromatogénicos como el o-Nitrofenol- β -D-galactopiranosido (ONPG).⁸ Así mismo, en cada trabajo los autores varían el buffer empleado para la reacción de hidrólisis, tales como buffer fosfato (BP),^{29,30,34} buffer milk,⁸ buffer de ácido láctico,³¹ buffer Tris-maleato-NaOH,³⁵ entre otros. Estas variaciones influyeron en los resultados obtenidos. Los diferentes sustratos mediaron por las diferencias en afinidad que tenga la enzima por cada uno de ellos. Dependiendo del buffer empleado, se obtendrán resultados diferentes, dado que los iones presentes en el medio y la concentración de estos intervinieron en la

actividad de la enzima,³³ porque en algunos casos, son cofactores necesarios para inducir la reacción enzimática. Para la mayoría de las β -galactosidasas estudiadas, los iones metálicos divalentes son importantes, en especial el Mg^{2+} es considerado el ion fisiológico.^{36,37,38,39} Cuando el potencial magnesio (pMg) está por debajo de 7, la enzima es más eficiente y tiene una afinidad más alta por el sustrato.^{27,39} Los iones divalentes Mn^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} son importantes para la actividad catalítica de muchas β -galactosidasas.^{36,39,40} Hay estudios que demuestran que los cationes monovalentes como Na^+ y K^+ son activadores de la enzima, mientras que Hg^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} son inhibidores de la actividad de algunas β -galactosidasas.^{28,40,41}

Para este trabajo se eligió la buffer BM, porque tiene una composición de sales similar a la de la leche, y por ende a la del lactosuero, lo cual permitió comparar la actividad en ambas matrices. La enzima fue más activa en lactosuero, pero por muy poca diferencia frente a las soluciones de lactosa, por tanto es necesario tener en cuenta esta pequeña diferencia, al considerar que el comportamiento de la enzima en un medio más real como el lactosuero será un poco diferente en cuanto a sus parámetros cinéticos, ya que la actividad de la enzima es más alta en este medio. También es válido aclarar, que la buffer BM en cuanto a sales tuvo una composición un poco diferente a la del lactosuero, por que se asemeja más a la leche, mientras que el lactosuero tiene algunas sales como el NaCl, en concentraciones más altas que la leche, debido al procesamiento del queso. Esta sal aporta Na^+ a la solución, y este ion es un activador importante para algunas β -galactosidasas, incluyendo la de *Kluyveromyces lactis*.⁸

Para discriminar los modelos cinéticos, y elegir finalmente el modelo que representó mejor la cinética de la enzima, se hizo necesario más que el grado de ajuste de cada modelo, una linealización de los resultados que hiciera posible evidenciar el tipo de inhibición por producto (galactosa) que se presenta en este caso, y comparando los R^2 de los modelos, todos tienen grados de ajuste muy similares, por lo cual no pueden ser descartados solo por este criterio.

Luego de la linealización, mostrada en la Figura 4, se determinó que la enzima sigue un comportamiento de inhibición competitiva por galactosa, dado que la línea de tendencia de los datos experimentales para las corridas a diferentes concentraciones de galactosa, convergen en un mismo punto, es decir, tienen

Tabla 7. Condiciones de temperatura y pH de máxima actividad de enzimas β -galactosidasa de diferentes microorganismos.

Microorganismo	T (°C)	pH
<i>Escherichia coli</i> .	37	7-7,3
<i>Aspergillus niger</i> .	40-60	3,6
<i>Kluyveromyces fragilis</i> .	37-43	7
<i>Kluyveromyces lactis</i> .	34-40	7,5
<i>Kluyveromyces lactis</i> .	45	6,5

Modificada de:^{8,14,29-33}

el mismo intercepto, y por ello la V_{max} es constante independientemente de la concentración de galactosa (inhibidor) en el medio.⁴⁶ En este tipo de inhibición la molécula de galactosa no resulta químicamente alterada por la enzima.

Siguiendo lo propuesto por Michaelis-Menten, la constante del inhibidor K_i se define como la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor.²¹ K_i es comparable por tanto con K_m , constante de disociación del complejo enzima sustrato (ES). Según esto, se puede explicar los valores de K_m y K_i encontrados con el modelo elegido, donde se obtuvo un K_m de $8,01 \times 10^{-2} M$ y un K_i de $6,85 \times 10^{-2} M$. Como se puede ver estos dos valores son muy similares, por lo cual se puede decir que hay una inhibición competitiva, dado que tanto el complejo ES como el EP, se disocian de forma similar. Sin embargo, K_m tiene un valor muy inferior a la concentración de sustrato más alta empleada, por lo tanto, el complejo ES esta muy fuertemente unido y raramente se disocia sin que el sustrato reaccione para dar producto, por tanto, se infirió que la afinidad por el sustrato es alta. Con respecto a K_p , su valor también es bajo, pero no tanto comparado con las bajas concentraciones iniciales de galactosa, por tanto, si hay una inhibición competitiva, pero no es fuerte. Esto explicó el hecho de que el modelo 1, el cual no presentó inhibición, también se haya ajustado con R^2 aceptable, puesto que al ser la inhibición poco perceptible, afecta muy poco el grado de ajuste.

La **Tabla 6**, presenta el parámetro K_{mapp} , que hace alusión a la variación de la constante de disociación del complejo ES, como se puede ver este parámetro aumentó con la concentración de galactosa, lo cual quiere decir que, cuanto más galactosa hay en el medio, mas tiende a disociarse el complejo ES, y por tanto la afinidad de la enzima por el sustrato se vuelve más débil, ya que su sitio activo se encuentra reversiblemente ocupado por moléculas de galactosa.

En la literatura se han reportado estudios con β -galactosidasas de diferentes fuentes, que presentan así mismo modelos de inhibición diferentes. La β -galactosidasa de *E. coli* presenta inhibición competitiva por galactosa,²⁹ al igual que la de *K. fragilis*^{34,35} y *A. niger*.^{14,31,32} La β -galactosidasa de *A. oryzae* ha mostrado una inhibición no competitiva por galactosa. Se ha reportado también un comportamiento cinético de inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa para la β -galactosidasa de *K. lactis*.⁸

Se han reportado también valores de los parámetros cinéticos de β -galactosidasas de diferentes fuentes como lo muestra la **Tabla 8**, estos valores se encuentran en diferentes concentraciones de enzima y de proceso, lo cual hizo variar el valor de los parámetros cinéticos de la enzima. Por ejemplo, en la **Tabla 8** la enzima de *K. lactis* no presentó el mismo valor reportado en este trabajo, porque los autores, determinaron estos valores a 40°C y pH 7,2,⁸ mientras que en este trabajo se hizo a 45°C y pH 6,5. Además, no se trató del mismo extracto enzimático, así sea la enzima aislada del mismo microorganismo.

Tabla 8. Parámetros cinéticos K_m y K_i para β -galactosidasas de diferentes microorganismos.

Microorganismo	K_m (M)	K_i (M)
<i>Aspergillus oryzae</i> .	0,112 0,16	0,0045 0,0105
<i>Aspegillus niger</i> .	0,0539	0,0109
<i>Escherichia coli</i> .	0,00298 0,00373	0,034 0,082
<i>Kluyveromyces fragilis</i> .	0,0436	0,0519
<i>Kluyveromyces lactis</i> .	0,023	0,0153

Modificada de:^{8,34,42-44}

CONCLUSIONES

El pH y la temperatura pueden ser fijados en 6,5 y 45°C respectivamente, porque fueron las mejores condiciones de hidrólisis evaluadas, es decir, las condiciones bajo las cuales se obtuvo la mayor actividad de la enzima. Sin embargo, la enzima puede seguir hidrolizando exitosamente a temperaturas más altas, hasta 65°C, o más altas, pero con una actividad más baja. Con respecto al pH, al parecer la enzima presentó gran sensibilidad a cambios en esta condición, porque se evidenció que al aumentar o disminuir este valor en solo una unidad, la enzima pierde significativamente gran parte de su actividad, y a pH extremos la actividad es casi nula.

Se puede conseguir un 100% de hidrólisis en alrededor de una hora, empleando solo 0,1 g/L de enzi-

ma. Adicionando más enzima se obtendrá en el mismo tiempo el mismo porcentaje de hidrólisis, aunque la velocidad se verá ligeramente incrementada.

La velocidad de reacción se ve inhibida por galactosa, tal como se ha reportado en la literatura.^{35,45} El modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales fue Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa. Este modelo ha sido discriminado mediante su R^2 y la linealización de Lineweaver-Burk. Aunque es difícil la comparación de las constantes cinéticas obtenidas en los diversos estudios realizados, debido a cambios en las condiciones empleadas por los autores, en términos generales, los valores de K_m , K_i y V_{max} encontrados en este trabajo, son más altos que los reportados por otros autores para enzimas aisladas del mismo microorganismo. La siguiente ecuación (7) se presenta como el modelo predictivo que mejor representa la hidrólisis de lactosa del lactosuero empleando la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.

$$V = \frac{1,86 \times 10^{-2} C_s}{8,01 \times 10^{-2} \left(1 + \frac{C_p}{6,85 \times 10^{-2}} \right) + C_s} \quad (7)$$

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses para la publicación de este manuscrito.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Merquiand por suplir la enzima y brindar información para su caracterización. También al profesor Carlos Eduardo Mejía Gómez y al Grupo de Biotransformación de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia por la cooperación y desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Valencia E, Ramírez ML.** La industria de la leche y la contaminación del agua. Elementos: Ciencia y cultura. 2009; 16(73): 27-31.
- Hatzinikolaou DG, Katsifas E, Mamma D, Karagouni AD, Christakopoulos P, Kekos D.** Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. Biochemical Engineering Journal. 2005; 24: 161-172.
- Fu J, Tseng Y.** Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. Environ Microbiol. 1990; 56: 919-923.
- Huang Y, Yang S.** Acetate production from whey lactose using co-immobilized cells of homolactic and homoacetic bacteria in a fibrous-bed bioreactor, Biotechnol. Bioeng. 1998; 60: 498-507.
- Ramakrishnan S, Hartley B.** Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. Environ. Microbiol. 1993; 59: 4230-4235.
- Illanes A, Enzyme Biocatalysis.** 1ª ed. Valparaiso: Springer; 2008.
- Ladero M, Perez M, Santos A, Garcia-Ochoa F.** Hydrolysis of lactose by free and immobilized beta-galactosidase from *Thermus* sp. strain T2. Biotechnol. Bioeng. 2003; 81: 241-252.
- Santos A, Ladero M, Garcia-Ochoa.** 1998. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbial Technology. 1998; 22: 558-567.
- Harju M, Kallioinen H, Tossavainen.** Lactose Hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. International Dairy Journal 2012; 22: 104-109.
- Tomás CM.** Estudo da hidrólise da lactose por β -galactosidase na forma livre e imobilizada. 1998; 67.
- Nagodawithana T, Reed G.** Enzymes in Food Processing. 3ª ed. San Diego: Academic Press; 1993.
- Nunes MF, Roig SM, Alegre RM.** Produção e propriedade de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*-NRRLY-2415. Revista de Farmácia e Bioquímica USP. 1993; 29(1): 25-30.
- Mahoney RR.** Lactose: Enzymatic Modification. In: Advanced Dairy Chemistry. London: Fox PF. and P. McSweeney, Eds; 1997: 77-125.
- Papayannakos N, Markas G, Kekos D.** Studies on modeling and simulation of lactose hydrolysis by free and immobilized β -galactosidase from *Aspergillus niger*. ChemEng J. 1993; 52: 1-12.
- Adam AC, Rubio-Teixeira M, Polaina J.** Lactose: The milk sugar from a biotechnological perspective. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2004; 44(7-8): 553-7.
- James E, Noble, Mark JA, Bailey.** Quantitation of protein. Methods in Enzymology. 2009; 463: 73-95.
- AOAC International.** Official Methods of Analysis, USA, 2011.
- Sacks DB.** Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwoods ER, Editors. Textbook of Clinical Chemistry. Third Edi-

- tion. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999. p: 750-808.
19. **Skoog DA, West DM, Holler FJ and Crouch SR.** Fundamentals of Analytical chemistry, Thompson Learning – Brooks/Cole, 2004. Chap 29, "Kinetics Methods of Analysis" p. 878-905.
 20. **Nelson DL, Cox MM.** Lehninger Principios de Bioquímica. 5ª Edición. New York: W. H. Freeman and Company; 2008.
 21. **Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L.** Biochemistry. Seventh Edition. 2010.
 22. **Beadle BM, Baase WA, Wilson DB.** Comparing the thermodynamic stabilities of a related thermophilic and mesophilic enzyme. Biochemistry. 1999; 38(8): 2570-2576.
 23. **Shaikh SA, Khire JM, Khan MI.** Production of galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. Biochim Biophys Acta. 1999; 1472(1-2): 239-45.
 24. **Pessela BC, Vian A, Mateo C, Fernández-Lafuente R, García JL, Guisán JM, et al.** Overproduction of *Thermus* sp. Strain T2 beta-galactosidase in *Escherichia coli* and preparation by using tailor-made metal chelate supports. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(4): 1967-72.
 25. **Adalberto PR, Massabni AC, Goulart AJ, Contiero J, Carmona EC, Cardello L, et al.** Production of β -galactosidase by *Trichoderma reesei* FTKO-39 in wheat bran: partial purification of two isozymes. Appl Biochem Biotechnol. 2006; 133(2): 163-70.
 26. **Hoyoux A, Jennes I, Dubois P, Genicot S, Dubail F, François JM, et al.** Cold-adapted β -galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(4): 1529-35.
 27. **Fernandes S, Geueke B, Delgado O, Coleman R.** Beta-galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis. Appl Microbiol Biotechnol. 2002; 58: 313-21.
 28. **Wadiak DT, Carbonell RG.** Kinetic behavior of microencapsulated β -galactosidase. Biotechnol. Bioeng. 1975; 17: 1157-1181.
 29. **Berrueta J, Garcia T.** Hidrólisis enzimática de lactosa en reactores de lecho fijo. Ing. Química. 1988; 236: 141-146.
 30. **Yang ST, Okos MR.** A new graphical method for determining parameters in Michaelis-Menten-type kinetics for enzymatic lactose hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. 1989; 34: 763-773.
 31. **Flaschel E, Raetz E, Renken A.** The kinetics of lactose hydrolysis for the β -galactosidase from *Aspergillus niger*. Biotechnol. Bioeng. 1982; 24: 2499-2518.
 32. **Adalberto PR, Massabni AC, Carmona EC, Goulart AJ, Marques DP, Monti R, et al.** Effect of divalent metal ions on the activity and stability of β -galactosidase isolated from *Kluyveromyces lactis*. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. 2010; 31: 143-150.
 33. **Carrara CR, Rubiolo AC.** Determination of kinetics parameters for free and immobilized β -galactosidase. Process Biochem. 1996; 31(3): 243-248.
 34. **Jurado E, Camacho F, Luzon G and Vicaria JM.** A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbial Technology 31 (2002): 300-309.
 35. **Guven RG, Kaplan A, Guven K, Matpan F and Dogru M.** Effects and various inhibitors on β -galactosidase purified from the thermoacidophilic *Alicycloclobacillus acidocaldarius* Subsp. *Rittmannii* isolated from Antarctica. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2011; 16: 114-119
 36. **Martinez-Bilbao M, Gaunt MT, Huber RE.** E461H-beta-galactosidase (*Escherichia coli*): altered divalent metal specificity and slow but reversible metal inactivation. Biochemistry. 1995; 34(41):13437-42.
 37. **Craig DB, Hall T, Goltz DM.** *Escherichia coli* α -galactosidase is heterogeneous with respect to a requirement for magnesium. Biometals. 2000; 13: 223-229.
 38. **Sutendra G, Wong S, Fraser ME, Huber RE.** Beta-galactosidase (*Escherichia coli*) has a second catalytically important Mg^{2+} site. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 352(2): 566-70.
 39. **Harada M, Inohara M, Nakao M, Nakayama T, Kakudo A, Shibano Y, et al.** Divalent metal ion requirements of a thermostable multimetal beta-galactosidase from *Saccharopolys poraerectivirgula*. J Biol Chem. 1994; 269(35): 22021-26.
 40. **Roth NJ, Huber RE.** The beta-galactosidase (*E. coli*) reaction is partly facilitated by interactions of His-540 with the C6 hydroxyl of galactose. J Biol Chem. 1996; 271: 14296-302.
 41. **Osiriphun S and Jaturapiree.** Isolation and Characterization of β -galactosidase from the thermophile B1.2. Asian Journal of Food and Agro-industry. 2009; 2(04): 135-143.
 42. **Ladero M, Santos A, García-Ochoa F.** Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme MicrobTechnol 2000; 27: 583-92.
 43. **Heng MH, Glatz CE.** Ion exchange immobilization of charged β -galactosidase fusions for lactose hydrolysis. Biotechnol Bioeng. 1994; 44: 745-52.
 44. **Kim CS, Ji ES, Oh DK.** Expression and Characterization *Escherichia coli*. Biotechnology Letters. 2003; 25: 1769-1774.