

Inmovilización covalente de β -galactosidasa de *A. fonssecaeus* sobre derivados celulósicos del maíz. Comparación con la β -galactosidasa del *A. oryzae*.

R. GONZÁLEZ¹, P. MONSAN², O. ROS³ y F. ESCALE²

¹ Instituto Nacional de Endocrinología, calle D entre 29 y Zapata, La Habana, Cuba

² ERA CNRS 879 INSA, Toulouse, Francia

³ Facultad de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba

Recibido en enero de 1988

RESUMEN

La β -galactosidasa del *A. fonssecaeus* con actividad específica entre 19-24 U/mg, a concentraciones de 1.6-3.3 g/l y pH 8,6, fue inmovilizada covalentemente sobre derivados celulósicos del maíz (DCM), con altos rendimientos (667 U/g de DCM). El mayor porcentaje de enzima inmovilizada y los valores superiores de actividad enzimática por gramo de soporte, se obtuvieron con el empleo de DCM de 0,8 mm.

Fueron determinadas algunas características cinéticas de la β -galactosidasa inmovilizada de *A. fonssecaeus* y *A. oryzae* en reactor antidifusional utilizando ortonitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) y lactosa como sustrato. La enzima de *A. fonssecaeus* presenta valores de K_m aparente inferiores a la de *A. oryzae* en forma inmovilizada, contrario a lo que ocurre en forma libre. La hidrólisis continua de soluciones de lactosa en reactores de columna empacada con DCM β -galactosidasa de ambos microorganismos, produjo resultados similares y comparables a los obtenidos en otros sistemas reportados. La enzima inmovilizada del *A. fonssecaeus* fue muy estable; los tiempos de vida media a 35°C y 50°C, fueron de 240 y 80 días respectivamente. La enzima inmovilizada puede ser empleada para la hidrólisis continua de la lactosa del suero lácteo a 50°C y pH 4,5 con una productividad de 0,9 g de lactosa/g de DCM-enzima/hora.

SUMMARY

β -galactosidase from *Aspergillus fonssecaeus* with a specific activity between 19-24 U/mg., at concentrations 1.6-3.3 g/l and pH 8.6 was covalently immobilized with high yield (667 U/g) on corn cellulose derivatives (CCD). The highest percentage of immobilized enzyme and the highest values of enzymatic activity per gram of support, were obtained with CCD particles of 0.8 mm.

We determined some kinetic characteristics of immobilized β -galactosidase from *A. fonssecaeus* and *A. oryzae* in an anti-diffusional reactor using ONPG and lactose as substrates. The immobilized enzyme form *A. fonssecaeus* showed lower apparent K_m values than that from *A. oryzae*, in contrast to what occurs when they are both in the free form. Continuous hydrolysis of lactose solution in reactors containing columns packed with CCD- β -galactosidase from both sources yielded similar results, which are comparable to those reported for other systems.

The immobilized enzyme from *A. fonssecaeus* was considerably stable, presenting half lives of 240 and 80 days at 35°C and 50°C, respectively. It may be employed for the continuous hydrolysis of whey at 50°C and pH 4., with a productivity of 0.9 galactose/g, CCD-enzyme/hour.

INTRODUCCION

Las razones fundamentales de que sólo aparezca un reducido número de enzimas inmovilizadas en uso comercial, son el costo del desarrollo, la optimización de los sistemas y la dificultad de su introducción en la industria para sustituir procesos químicos o con enzimas solubles.

La β -galactosidasa ha sido inmovilizada sobre una gran variedad de soportes. Entre los principales sistemas que han tenido mayor éxito industrial se encuentran el desarrollado por Olson *et al.* (1973), que utiliza como soporte una resina de fenol-formaldehído; el de Weetall *et al.* (1974) con vidrio poroso y el reportado por Charles *et al.* (1974), que emplea partículas metálicas.

Nosotros, en trabajos previos hemos inmovilizado la β -galactosidasa del *A. fonscaeus* sobre sílice aminada (Spherosil) con resultados satisfactorios (González, *et al.*, 1987).

Sin embargo, estos soportes inorgánicos resultan caros y presentan ciertos inconvenientes en su utilización industrial, por ello, en este trabajo hemos estudiado la inmovilización de la β -galactosidasa del *A. fonscaeus* sobre un soporte más barato: DCM, que representa un desecho agroindustrial y hemos comparado las características y la eficiencia del proceso con la β -galactosidasa comercial del *A. oryzae*.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Soporte: Se utilizaron partículas de DCM de 0,2 y 0,8 mm obtenidas de la zona central de la tusa de maíz, que constituye un desecho agroindustrial. Las muestras utilizadas para este estudio fueron adquiridas en la Sociedad francesa EURAMA.

Preparados enzimáticos: Los preparados enzimáticos semipurificados con actividad β -galactosidásica (13,4 - 24 U/mg de proteína; 1,6 - 3,3 g de proteína/l) fueron obtenidos a partir de extractos acuosos de los cultivos del *A. fonscaeus* en medio salvado de trigo -HCl.

Se utilizaron también preparados de β -galactosidasa del *A. oryzae* (82 U/mg; 1,6 - 3,3 g de proteína/l) obtenidos a partir de la enzima comercial de Lab. Miles (RFA).

Métodos

Activación del soporte: Se realizó según el método descrito por Monsan (1979). La duración de las etapas fue la siguiente: oxidación con NaIO₄, 22,5 h; aminación con etilendiamina, 48 h; acople al glutaraldehído, 6 h.

Inmovilización: A las partículas de DCM activadas se les adicionaron los preparados enzimáticos de las β -galactosidas en buffer pirofosfato de sodio 0,05 M, pH 8,6 de los microorganismos descritos anteriormente, y se agitaron en mezclador bidireccional a 4°C durante 18 horas. Posteriormente, las partículas fueron lavadas con el buffer de fijación y con solución de NaCl 1 M y finalmente con buffer acetato de sodio 0,1 M, pH 4,5 y mantenidas en este último hasta su utilización.

Determinación de actividad enzimática y de proteínas totales: La actividad de los preparados enzimáticos se determinó utilizando ONPG por el método modificado por nosotros (González, *et al.*, 1987) y con lactosa por el método enzimático de la galactosa deshidrogenasa (Boehringer-Mannheim). A los complejos enzima-soporte se les determinó la actividad enzimática por adición de ONPG 50 mM en tampón citrato fosfato 0,1 M, pH 3. La mezcla se mantuvo en agitación 10 min a la temperatura del ensayo; se tomaron alícuotas o se detuvo la reacción por inmersión en baño de hielo. Cuando se usaron soluciones de lactosa o suero lácteo, se determinó la actividad enzimática por el método descrito para la enzima soluble.

Las proteínas totales de los preparados enzimáticos y de los sobrenadantes de la inmovilización se determinaron por el método de Lowry *et al.* (1951).

Determinación de las características cinéticas de las β -galactosidas inmovilizadas: Se utilizó un reactor diferencial, donde fueron colocadas las partículas de DCM-enzima entre dos mallas metálicas. El reactor y los sustratos (ONPG y lactosa), se mantuvieron a 37°C durante toda la manipulación. Se realizó un estudio previo para conocer el flujo de sustrato necesario para alcanzar la velocidad máxima de reacción. A flujo constante para todas

las experiencias se ensayaron diferentes concentraciones de ONPG (3-50 mM) y de lactosa (10,5-60 g/l). Se tomaron alícuotas del efluente del reactor a tiempos entre 0 y 8 min, y se calcularon las velocidades de reacción máxima y las K_m aparentes de las enzimas inmovilizadas.

Hidrólisis de la lactosa en reactores DCM- β -galactosidasa: Se confeccionaron reactores en columna empacada de diferentes volúmenes (2,8; 14 y 70 ml) conteniendo las β -galactosidasas inmovilizadas de los dos microorganismos. Se experimentaron diferentes flujos (0,1-5 ml) de soluciones de lactosa (50 g/l) en buffer acetato, 0,1 M, pH 4,5 a 37°C. Se calculó la productividad, la tasa de conversión y el tiempo de retención en cada experiencia.

Estabilidad de los reactores DCM- β -galactosidasa: Los reactores de DCM- β -galactosidasa del *A. fonsaecus* se mantuvieron a temperatura de 35°C y 50°C, con flujo constante (0,1 ml/min) de solución de lactosa (50 g/l) en tampón acetato 0,1 M, pH 4,5. La estabilidad de la enzima inmovilizada se calculó en función de la actividad enzimática residual de los reactores.

Hidrólisis de la lactosa del suero lácteo: Se confeccionó un reactor de 80 ml con DCM- β -galactosidasa del *A. fonsaecus*, para evaluar la hidrólisis continua de la lactosa del suero lácteo. El suero se obtuvo por precipitación isoeléctrica de la caseína de la leche descremada en polvo por adición de HCl. El reactor y el sustrato se mantuvieron a 50°C y se aplicaron flujos de alimentación variables entre 60 y 600 ml/h; se calculó la productividad, la eficiencia y el tiempo de retención del proceso.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en la inmovilización covalente de la β -galactosidasa de *A. fonsaecus* sobre DCM, de diferentes diámetros medios. El mayor porcentaje de enzima inmovilizada activa y los más altos valores de actividad enzimática por gramo de soporte, se obtuvieron con el empleo de partículas de DCM de 0,8 mm. La utilización de las partículas de mayor diámetro presenta ventajas desde el punto de vista del rendimiento de la inmovilización y del empleo práctico en la confección de reactores enzimáticos, por su mayor solidez y resistencia al proceso de inmovilización, así como al uso repetido de las partículas.

Tabla 1
INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE LA PARTICULA DE DCM SOBRE LA INMOVILIZACION
DE LA β -GALACTOSIDASA DELA. FONSECAEUS

| Diámetro medio DCM (mm) | Actividad enzima inmovilizada (U/g) | Enzima inmovilizada actividad total (%) |
|----------------------------|--|--|
| 0,2 | 137,1 | 7,85 |
| 0,8 | 229,6 | 13,15 |

En los estudios posteriores se utilizaron estas partículas para la determinación de otros parámetros.

Este soporte, en las condiciones ensayadas, es capaz de fijar covalentemente una cantidad de enzima, 2,5 veces superior a lo obtenido en la inmovilización sobre sílice aminada (González *et al.*, 1987) por lo que resulta ventajosa la utilización de DCM aun sin tener en cuenta su inferior costo.

En la determinación de parámetros cinéticos de las enzimas de *A. fonsaecus* y *A. oryzae*, los preparados iniciales tuvieron la misma actividad enzimática (10,9 U/ml). A partir de estos se obtuvieron complejos DCM- β -galactosidasa de 261 U/g y 251 U/g de las enzimas de *A. fonsaecus* y *A. oryzae*, respectivamente.

El flujo correspondiente a un mínimo de fenómenos de difusión externa fue de 1,46 ml/min, el cual se mantuvo constante durante todas las manipulaciones efectuadas en el reactor antidifusional. Los parámetros cinéticos de las dos β -galactosidasas inmovilizadas, calculados

en este reactor, se muestran en la tabla 2. Con excepción de la β -galactosidasa de *A. fonscaeus* con ONPG como sustrato, las K_m aparentes aumentan con respecto a las enzimas libres (González *et al.*, en preparación).

Tabla 2

COMPARACION DE PARAMETROS CINETICOS DE LAS β -GALACTOSIDASAS DE *A. FONSECAEUS* Y *A. ORYZAE* INMOVILIZADAS SOBRE DCM

| Enzima | β -galactosidasa <i>A. fonscaeus</i> | | β -galactosidasa <i>A. oryzae</i> | |
|--------------------------------|---|---------|--|---------|
| | Sustrato | Lactosa | Sustrato | Lactosa |
| Km (mM) | 2,35 | 86,86 | 11,70 | 103,03 |
| V. max. μ mol/min/g DCM | 213,74 | 94,19 | 509,55 | 187,36 |

La disminución de las K_m de la enzima inmovilizada del *A. fonscaeus* con respecto a las de la *A. oryzae*, resulta ventajosa para el empleo de reactores de la primera en paralelo para el tratamiento del suero lácteo, donde se establece un gradiente de concentración negativo a medida que el flujo de sustrato avanza por el sistema de reactores.

Los resultados obtenidos con diferentes flujos de soluciones de lactosa a 35°C se muestran en la figura 1.

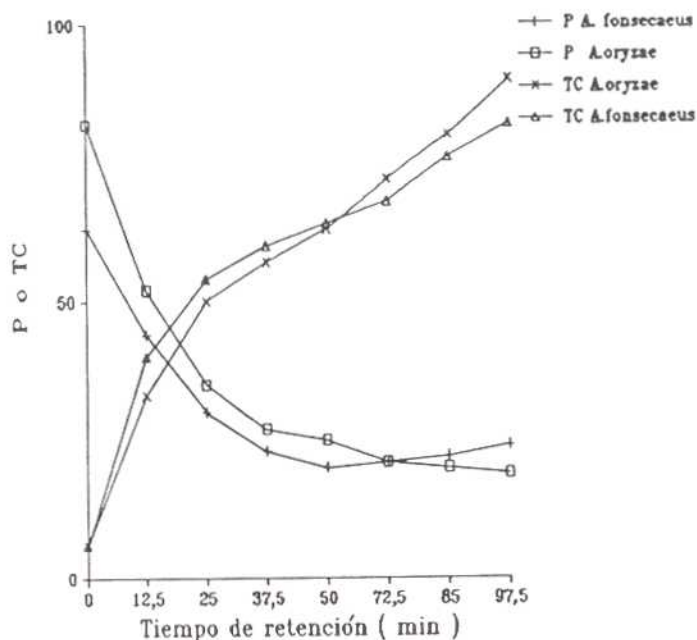


FIG. 1. Comparación de la productividad y tasa de conversión de las β -galactosidasas de *A. fonscaeus* y *A. oryzae* inmovilizadas sobre DCM.

P: productividad,

TC: tasa de conversión $\cdot 10^2$.

Se emplearon reactores en columnas empacadas con DCM-enzima de 225 U/g y 230 U/g para las β -galactosidasas de *A. fonsecaeus* y de *A. oryzae*, respectivamente. Estos datos permiten determinar el flujo necesario para la obtención de una tasa de hidrólisis del 80%; en estas condiciones el tiempo de retención fue de 56,3 min para la enzima de *A. fonsecaeus* y 58,6 para la del *A. oryzae*, lo que corresponde a una productividad de 0,22 g de lactosa/hora/gramo de DCM-enzima. Aunque la actividad máxima es superior para la enzima del *A. oryzae* en el reactor antidifusional, las actividades de ambas β -galactosidasas son prácticamente idénticas en el reactor de columna empacada.

Si se tiene en cuenta que la enzima del *A. fonsecaeus* fue inmovilizada a partir de preparados semipurificados con actividad específica entre 19 y 22 U/mg, y que la actividad específica de la enzima comercial de *A. oryzae* fue de 82 U/mg, pueden destacarse las ventajas de la utilización de esta nueva fuente de β -galactosidasa microbiana.

En otros sistemas ensayados, la inmovilización covalente de la enzima comercial de *A. oryzae* sobre óxido de zirconio-partícula de vidrio (CPG-ZrO₂) de 40-80 mesh, produjo una actividad inicial de 50-100 U/g de soporte a 60°C. Los reactores en columna empacada realizaron la conversión del 80% de soluciones de lactosa (5-10%) con un flujo de 0,083 ml/min (Weetall *et al.*, 1974). En nuestros resultados se evidencian las ventajas de la utilización de las partículas de DCM como soporte de inmovilización, sobre todo si se tiene en cuenta el rendimiento de los procesos de fijación covalente (U/g) y se observa que la temperatura utilizada en los reactores fue casi dos veces mayor.

En la figura 2 se muestra la comparación de la estabilidad de dos reactores con la enzima inmovilizada de *A. fonsecaeus* sometidos a flujo continuo de solución de lactosa al 5% a temperaturas de 35°C y 50°C, respectivamente.

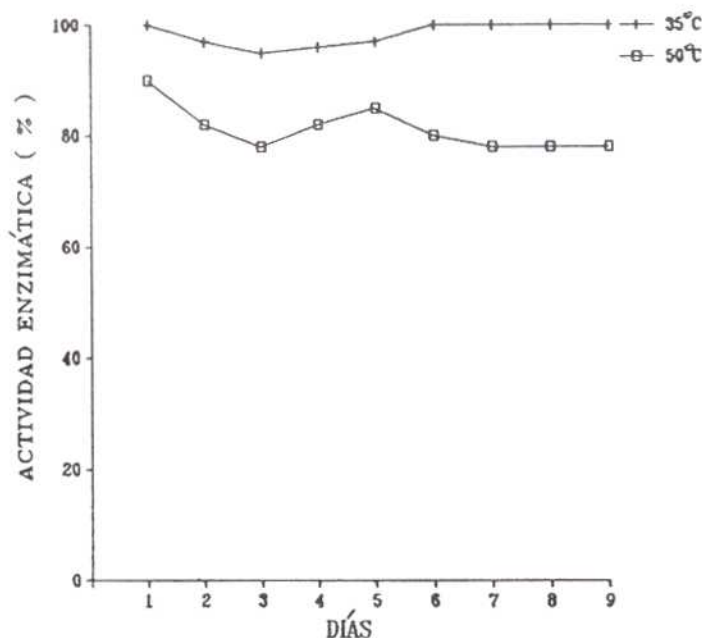


FIG. 2. Estabilidad de reactores con DCM- β -galactosidasa del *A. fonsecaeus*.

El reactor de 35°C no presentó pérdida de la actividad enzimática después de ocho días de hidrólisis continua; durante este tiempo el otro reactor retuvo el 85% de la actividad inicial.

Teniendo en cuenta que la enzima libre mantiene el 77% de la actividad inicial al cabo de 70 días a 35°C (González, et al., en preparación), y que la estabilidad de las enzimas inmovilizadas por enlace covalente comúnmente aumenta, entonces es posible predecir largos tiempos de vida media para la β -galactosidasa inmovilizada cuando se hace pasar sustrato continuamente. El mismo análisis puede establecerse en el caso del reactor a 50°C; la vida media del complejo DCM-enzima a esta temperatura resultará superior a 35 días, valor alcanzado con la enzima libre (González, et al., en preparación). La vida media calculada para los dos reactores fueron de 240 y de 80 días a flujo constante de sustrato y temperaturas de 35°C y 50°C respectivamente.

Resultó de gran interés el estudio de la hidrólisis de la lactosa de suero lácteo en reactores DCM- β -galactosidasa de *A. fonsecaeus*. El preparado enzimático fue obtenido a partir de la enzima liofilizada con 4 440 U y 24 U/mg de proteína. Se utilizaron 100 ml de DCM activado. La actividad de la enzima inmovilizada a 1,6 g/l fue de 667,6 U/g de DCM.

La figura 3 muestra los resultados obtenidos en reactores de 80 ml en columna empacada sometidos a diferentes flujos de suero lácteo a 50°C. La mayor efectividad de hidrólisis se obtuvo con valores de flujo entre 60 y 130 ml/hora. En valores superiores, disminuye proporcionalmente el porcentaje de hidrólisis.

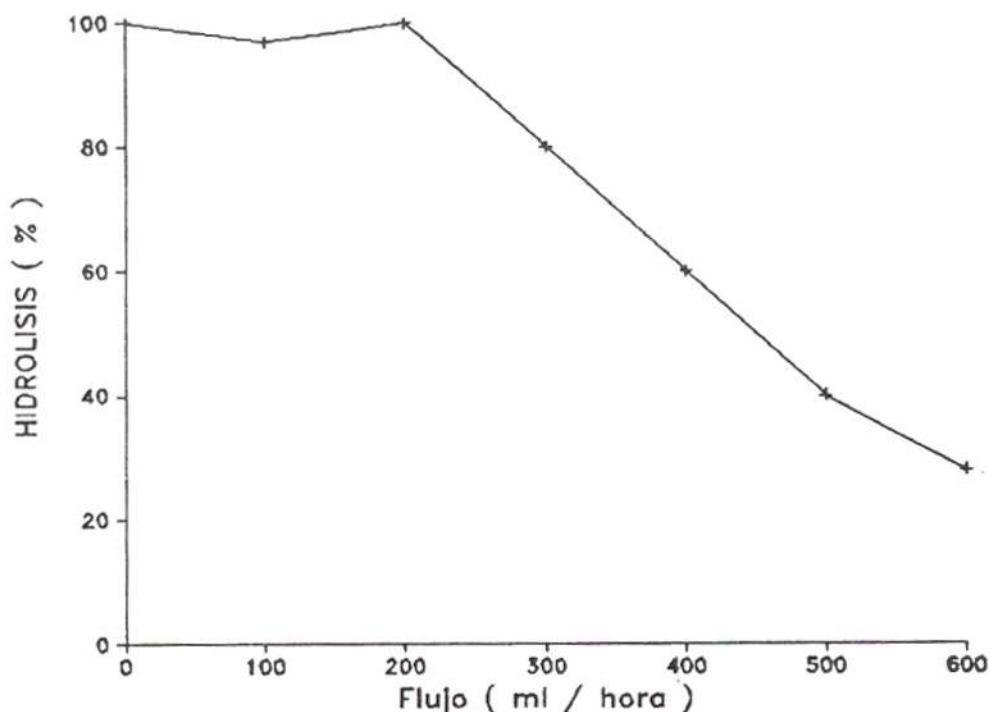


FIG. 3. Hidrólisis de la lactosa del suero lácteo en reactor de DCM- β -galactosidasa.

Considerando que la reducción entre el 60% y el 80% de la lactosa del suero posibilita la utilización de este en la alimentación humana y evita los problemas tecnológicos para su empleo (Zadow, 1984), con el uso de estos reactores es posible obtener esta tasa de hidrólisis a flujo constante entre 200 y 300 ml/hora. En las condiciones experimentales ensayadas, un reactor de estas características es capaz de hidrolizar en ocho horas 30 veces su volumen en suero lácteo. Dichos reactores pueden ser acoplados en paralelo, lo que aumentaría su eficiencia grandemente, disminuyendo el tiempo de retención y posibilitando la utilización de flujos significativamente superiores.

En la tabla 3 se muestran los valores de productividad, eficiencia y tiempo de retención obtenidos en los reactores en diferentes flujos de sustrato. Los tiempos de retención óptimos se encuentran entre 0,61 y 1,3 min. La productividad máxima se alcanzó a flujos entre 300 y 550 ml/hora, correspondientes a 24,75 moles de lactosa/hora $\cdot 10^{-3}$, o sea, 0,9 g de lactosa/g DCM-enzima/hora.

Tabla 3
PARAMETROS TECNICOS DEL REACTOR DCM- β -GALACTOSIDASA DEL *A. FONSECAEUS*

| Flujo (ml/h) | Productividad lactosa hidrolizada (mol/h $\cdot 10$) | % de eficiencia (hidrolisis/g DCM) | Tiempo de retención (min) |
|-----------------|---|---------------------------------------|------------------------------|
| 60 | 7,66 | 10,65 | 1,33 |
| 130 | 17,56 | 11,26 | 0,61 |
| 300 | 24,75 | 6,86 | 0,26 |
| 400 | 21,64 | 4,49 | 0,20 |
| 550 | 22,33 | 3,37 | 0,14 |

Estos resultados son comparables a los obtenidos por otros autores con diferentes enzimas fúngicas (Olson *et al.* 1973; Weetall *et al.*, 1974; Ford *et al.*, 1974; Pitcher, 1978 y Dohan *et al.*, 1980).

CONCLUSIONES

La β -galactosidasa semipurificada de *A. fonsecaeus* puede ser inmovilizada sobre DCM con altos rendimientos, comparables a los obtenidos con la enzima comercial de *A. oryzae*.

La inmovilización covalente de la β -galactosidasa de *A. fonsecaeus* sobre DCM, provoca cambios en la K_m aparente y V_{max} con respecto a la enzima libre y a la β -galactosidasa inmovilizada de *A. oryzae*.

Con el uso de reactores en columnas empacadas de DCM- β -galactosidasa de *A. fonsecaeus*, puede realizarse la hidrólisis continua de soluciones de lactosa a 35°C y 50°C con alta retención de la actividad enzimática.

La β -galactosidasa semipurificada e inmovilizada sobre DCM puede ser utilizada con resultados altamente satisfactorios en el tratamiento del suero lácteo, para la reducción del 80% del contenido de lactosa, con vistas a su empleo en la alimentación humana y animal.

REFERENCIAS

- CHARLES, M.; Y. MIYABE; M. NARITA; K. KOIZUMI; H. TSUZUKI y F. X. HASSELBER (1974). "Lactose immobilized on stainless steel other dense metal and metal oxide support", en: *Immobilized Biochemical and Affinity Chromatography*. R. B. Dunlap, Ed., Plenum Press., New York.
- DOHAN, L. A.; J. L. BARET; S. PAIN y P. DELANDE (1980). *Lactose hydrolysis by immobilized lactase: semi-industrial experience*. *Enz. Eng.* 5: 279.
- FORD, J. R. y W. H. PITCHER (1974). *Immobilized lactase system*. Paper presents at Whey Product Conference. Rosemont, IL. Sep. 18.
- GONZALEZ, R. R. y P. MONSAN (1987). *Production and purification of β -galactosidase from A. fonsecaeus*. En preparación.
- MONSAN, P. (1979). *Enzyme immobilizee sur un support solide*. Brevet Francais, Demande No. 79- 31387.
- LOWRY, D. H.; H. J. ROSEBROUGH; A. L. FARR y R. J. RANDALL (1951). *Protein measurement with the Folin Phenol reagent*. *J. Biol. Chem.* 139: 265.
- OLSON, A. C. y W. L. STANLEY (1973). *Lactase and other enzymes bound to a phenol- formaldehyde resin with glutaraldehyde*. *J. Agri. Food Chem.* 21(3): 44-45.
- PITCHER, W. H. (1978). "Immobilized lactase for whey hydrolysis. Stability and operating strategy", en: *Enzyme Engineering*. Vol. 3: 483-496., Inc. Publ., New York.
- WEETALL, H. H.; N. B. HAVEWALA; W. H. PITCHER; C. C. DETAR; W. P. VANN y S. YAVERBAUM (1974). *The preparation of immobilized lactase and its use in the enzymatic hydrolysis of acid whey*. *Biotechnol. Bioeng.*, 16: 295.
- ZADOW, J. G. (1984). *Lactose properties and uses*. Symposium: "Production and Utilization of Whey and Whey components". *J. Dairy Sci.*, 67(11): 2654-2679.