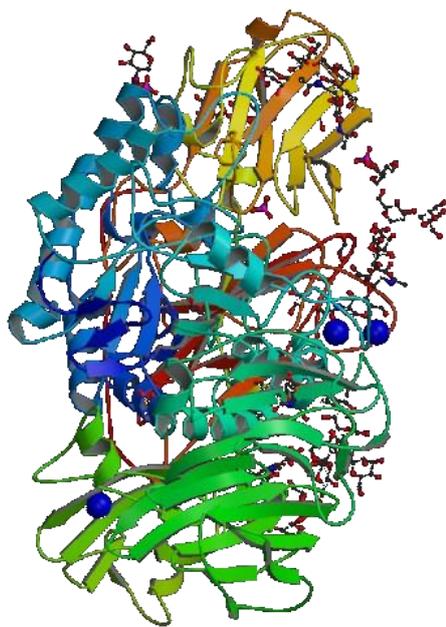


# TRATAMIENTO DE SUEROS LÁCTEOS MEDIANTE UN BIORREACTOR CON $\beta$ -GALACTOSIDASA INMOVILIZADA



Segura Contreras, Daniel



## **Índice**

1. *Resumen.*
2. *Objetivos del Proyecto.*
3. *Introducción.*
4. *Materiales y Métodos.*
5. *Exposición de Resultados.*
6. *Discusión de Resultados.*
7. *Bibliografía.*

## Resumen

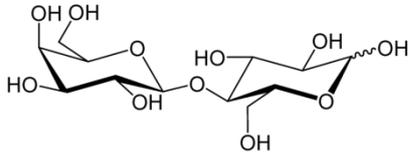
En este manuscrito se muestra un estudio de la enzima  $\beta$ -galactosidasa proveniente del microorganismo *Aspergillus oryzae*, que cataliza la reacción de lactosa en glucosa y galactosa, con el objetivo de emplearla inmovilizada en amberlita en un biorreactor que lleve a cabo dicha hidrólisis. Para ello se realizaron varios experimentos, en primer lugar, con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de operación de la enzima. A partir de ellos se llegó a la conclusión de que a pH 4 y temperatura de 40 °C alcanza su máxima actividad, teniendo una vida media aproximadamente de 277 minutos. Seguidamente, se procedió al cálculo de las constantes cinéticas de la enzima, empleando tanto ONPG como lactosa como sustrato. Para el caso de ONPG se obtuvieron una  $K_m$  y  $V_{max}$  de 2,3 mM y 8,4 U/mg, respectivamente, además de una constante de especificidad ( $K_m/K_{cat}$ ) de  $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ . En el caso de la lactosa los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  resultaron ser, respectivamente, 1,3 mM y 0,4 U/mg, siendo la constante de especificidad de  $35,04 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ . Asimismo se determinó para cada caso la  $K_i$  de la galactosa, que además de ser un producto de la hidrólisis es un inhibidor competitivo de la misma. El resultado fue de 6,6 mM para el ONPG y 1,247 mM para la lactosa. Tras esto, se inmovilizó un 86% de enzima en la resina amberlita IRC-50 de porosidad 0,465. Finalmente, se introdujo la resina con la enzima inmovilizada en una columna constituyendo un biorreactor y se hicieron pasar distintos caudales y concentraciones de suero lactosado. Se calcularon de esta forma los parámetros cinéticos de la enzima inmovilizada, siendo  $V_{max}=9,9\text{U/mg}$ ;  $K_m=18,79\text{mM}$ ;  $K_m/k_{cat}=55,46$ . En el biorreactor se obtuvieron unas conversiones máximas (para caudal de 3 ml/min y concentración de lactosa de 5 mM) del 99% según las mediciones experimentales y del 84% según la simulación informática del biorreactor con el programa Berekely-Madonna.

## Objetivo del Proyecto

Determinar las condiciones óptimas de trabajo de la enzima  $\beta$ -galactosidasa proveniente de *aspergillus oryzae* inmovilizada en amberlita IRC-50 para su empleo en la hidrólisis de lactosa en un biorreactor, además de la simulación de este proceso.

## Introducción

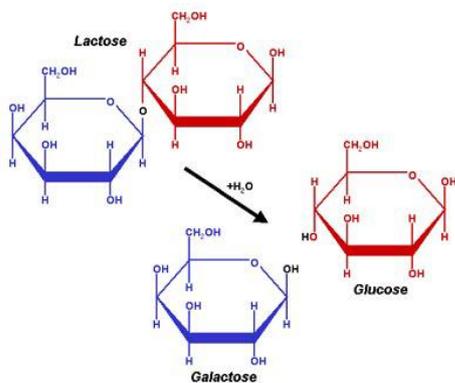
La lactosa es un disacárido resultante de la unión de una molécula de glucosa y una de galactosa mediante un enlace O-glucosídico:



El suero lácteo es un líquido que contiene entre un 4 y un 5 % de lactosa [1][2], además de vitaminas, minerales y un alto porcentaje de proteínas como la caseína, todos ellos disueltos en agua. En la industria, constituye un subproducto de la manufactura de quesos, caseína, caseinatos y mantequilla [3]. Asimismo, es un fuerte contaminante cuyo poder se debe a dos parámetros: la demanda biológica de oxígeno (DBO) y la demanda química de oxígeno (DQO) [1], es decir, los microorganismos requieren una gran cantidad de oxígeno para oxidarlo. Este es uno de los motivos por los cuales en los últimos años se han investigado los procesos para la eliminación de lactosa, además de otros como el de hacer accesible los productos lácteos a la población intolerante a la lactosa [4].

Ya se han descubierto y llevado a cabo distintos procesos para la hidrólisis de lactosa, como mediante resinas de intercambio iónico, ácidos fuertes o catálisis enzimática [5]. En este estudio se apostó por la catálisis enzimática, más adecuada para las condiciones en las que se iban a trabajar.

La enzima utilizada fue la  $\beta$ -galactosidasa, que cataliza la reacción de hidrólisis de lactosa para dar glucosa y galactosa:



El uso de la  $\beta$ -galactosidasa es una de las aplicaciones de enzima más prometedoras en la industria alimenticia. Las fuentes de esta enzima son distintos microorganismos como *Neurospora crassa*, *Saccharomyces fragilis*, *Lactobacillus helveticus* y diversos hongos de la rama *Aspergillus* [6].

Para este caso se utilizó un tipo de  $\beta$ -galactosidasa proveniente del hongo *Aspergillus Oryzae*, que ya ha sido estudiada anteriormente por Park, de Santi y Pastore [6], obteniendo unas condiciones óptimas de trabajo de pH 5 y 50 °C, una  $K_m$  de 0,77 mM y una  $V_{max}$  de 55,6 U/mg para el caso de ONPG como sustrato y de 50 mM y 2,4 U/mg en el experimento con lactosa. Anteriormente, también Tanaka, Kagamiishi, Kiuchi y Horiuchi[7] realizaron un análisis, obteniendo un pH óptimo de 4,5 y una  $K_m$  de 0,72 mM usando ONPG como sustrato y de 18 mM usando lactosa.

En este experimento se empleó en el biorreactor la enzima inmovilizada en amberlita, es decir, unida covalentemente a la superficie de la resina, de forma que su actividad catalítica se retenga. Las ventajas de la inmovilización son las siguientes [8]: aumento de la estabilidad de la enzima, aumento de la productividad por la capacidad de reutilización y aumento de la facilidad de recuperación y purificación de los productos. Los principales inconvenientes son una ligera disminución de actividad y un aumento de los problemas disfuncionales.

En este ensayo se ha caracterizado la enzima en sus dos estados: libre e inmovilizada, se ha estudiado su actividad para distintos pH y temperaturas y se ha estudiado la inhibición por la galactosa [9], para finalmente usarla inmovilizada en un biorreactor y observar las conversiones al hidrolizar suero lactosado.

## **Materiales y Métodos**

### *Instrumentos*

- Micropipetas de 100 y 1000  $\mu$ L.
- Tubos de ensayo.
- Tubos Eppendorf.
- Papel de parafina
- Espectrofotómetros.

- Cubetas para medir la absorbancia.
- Cronómetro.
- Baños termostáticos.
- Termómetro
- Vasos de precipitado.

### *Reactivos*

- $\beta$ -galactosidasa purificada de *Aspergillus Oryzae* 100  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\text{mg/ml}$  y 3  $\text{mg/ml}$
- ONPG 4 y 40 mM.
- Tampón fosfato-citrato a distintos pH.
- Tampón fosfato a pH 9,8
- Agua destilada.
- Glucosa 0,2 mM
- Galactosa 150 mM.
- Lactosa 100 mM.
- Mezcla enzimática (glucosa oxidasa + peroxidasa).
- Amberlita IRC-50.
- ONP 2 mM
- Sueros lactosados 5, 10, 20 y 50 mM.

### *Métodos*

Para calcular el efecto del pH sobre la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, se utilizó un tampón fosfato ajustado a diferentes pH y se midió la actividad realizando el ensayo estándar para los distintos casos. Los pH usados fueron 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; usando un blanco a pH 7.

Para medir la estabilidad térmica de la enzima, se prepararon 4 ml de tubos eppendorf con 1 ml de disolución de  $\beta$ -galactosidasa a 100  $\mu\text{g/ml}$  y se dejaron incubado en baños de 40, 60 y 70°C. Tras incubar 5, 10, 20, 40 y 60 minutos a cada temperatura, se

extrajeron 120  $\mu$ l de enzima y se depositaron en un eppendorf que se incubó durante 5 min en un baño con agua a temperatura ambiente. Tras esto, se utilizaron 100  $\mu$ l de la enzima enfriada para disparar la reacción con ONPG a temperatura ambiente, siguiendo el ensayo estándar de actividad. Se hizo también una medición a tiempo cero con la enzima sin incubar.

Con el fin de determinar las constantes cinéticas con ONPG como sustrato, se realizó una medida de actividad mediante el ensayo estándar a distintas concentraciones de ONPG: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1, 5, 10 y 20 mM a partir de un stock de ONPG 4 y 40 mM. El ensayo se realizó en presencia y ausencia de galactosidasa 30 mM, tomada a partir de un stock de 150 mM.

Para determinar las constantes cinéticas usando lactosa como sustrato se realizaron incubaciones en 4 tubos de ensayo de 10 ml, conteniendo cada uno 2,8 ml de una disolución de lactosa a concentración 100, 70, 40 y 20 mM en tampón fosfato a pH 4. La reacción comenzó con la adición de 0,2 ml de  $\beta$ -galactosidasa (3 mg/ml) tomándose una muestra de 0,3 ml a los 5, 1, 20, 40 y 60 minutos. Esta se colocó en un tubo eppendorf para parar la reacción introduciéndolo en un baño con agua a 70 °C durante 5 minutos. A continuación se diluyó la muestra con agua y se tomaron 0,4 ml para medir la glucosa formada mediante el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa.

Para inmovilizar la enzima en amberlita IRC-50, se llevó primero a cabo la preactivación de la misma siguiendo el protocolo de laboratorio. De un tubo conteniendo 20 ml de resina y 30 ml de tampón fosfato, se eliminó el tampón sobrante por decantación y se le añadieron 30 ml de  $\beta$ -galactosidasa 3 mg/ml. Se incubó con agitación durante 80 min, recogiendo muestras de 100  $\mu$ l del sobrenadante, diluyéndola y midiendo su actividad mediante el ensayo estándar. Como control a tiempo cero se midió la actividad de la disolución de enzima original.

Para determinar la porosidad de la amberlita se añadieron 2 ml de una disolución conteniendo ONP 2 mM a 2 ml de amberlita. Se determinó la absorbancia a 410 nm de la disolución de partida y de la diluida con amberlita, además de la de un blanco con agua.

Para realizar la hidrólisis de lactosa en el biorreactor, en primer lugar se procedió al empaquetado de la columna, vertiendo el gel con la enzima inmovilizada en una

columna de plástico de 20 ml y 1,3 cm de diámetro y añadiendo tampón fosfato 4,5 mM al reservorio superior de la columna para evitar que el gel se seque. Posteriormente, para la operación del biorreactor, se emplearon flujos de 2, 4, 8 y 12 ml/min utilizando suero lactosado a concentraciones de 50, 20, 10 y 5 mM. La puesta en marcha se realizó de la siguiente forma:

- Se dejó bajar el nivel de tampón del reservorio a ras de gel y se añadió el suero lactosado poco a poco, para no disturbar el lecho del gel. Se anotó el tiempo de comienzo. Igualmente se procedió para los 4 sueros distintos.
- Se tomó una muestra de tres gotas a la salida de la columna a los tiempos: 35 min (caudal 2 ml/min), 20 min (caudal 4 ml/min), 15 min (caudales 8 y 12 ml/min).
- Se diluyó cada muestra con agua.
- Se midió la glucosa formada por el método de glucosa oxidasa - peroxidasa estimando en todos los casos un 50% de conversiones.

Se usó un blanco con agua a la misma dilución que la muestra

### *Protocolos de laboratorio*

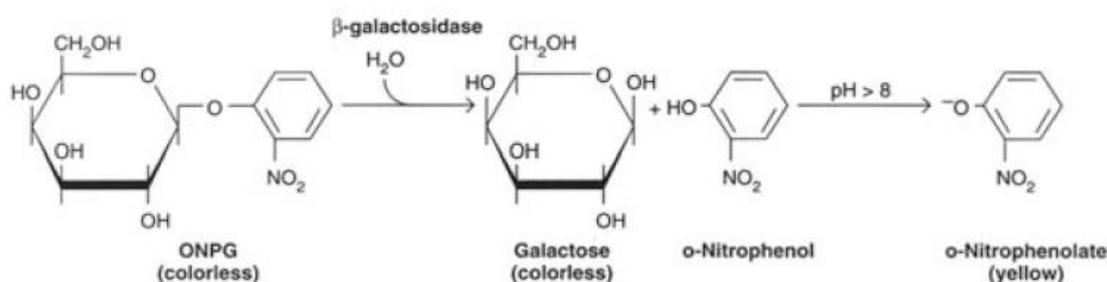
#### Ensayo estándar de actividad $\beta$ -galactosidasa

Preparar la siguiente mezcla de reactivos en tubos de 5 mL:

- |  |                     |
|--|---------------------|
| - Tampón fosfato-citrato 40 mM, pH 4,5.  | 200 $\mu$ L         |
| - ONPG 4 mM o Lactosa 150 mM.            | 500 $\mu$ L         |
| - $\beta$ -galactosidasa 100 $\mu$ g/mL. | 100 $\mu$ L         |
| - H <sub>2</sub> O                       | c.s.p. 1000 $\mu$ L |

Se preparan las disoluciones necesarias, añadiendo en último lugar la enzima y mezclando por inversión, tapando el tubo con papel de parafina, y se introducen en

baños a diferentes temperaturas. Ocurre la siguiente reacción:



Se incuba durante 10 minutos y se detiene la reacción añadiendo 3 mL de tampón borato 200 mM y pH 9,8. Por último, se mide la absorbancia a 410 nm.

De forma paralela, se mide un blanco (con los mismos componentes, exceptuando que el tampón borato se añade antes que la enzima para que no ocurra la reacción) y se medirá su absorbancia que servirá como referencia.

#### Protocolo de medida de glucosa mediante el método de glucosa oxidasa-peroxidasa

Se basa en la cuantificación de un compuesto coloreado producido por la oxidación de la glucosa y utilizando dosreacciones acopladas y catalizadas por la glucosa oxidasa (1= y la peroxidasa (2), que se desarrollan a punto final



Método:

Se prepara la siguiente recta patrón

Tubos (ml)	Blanco	1	2	3	4	5	6
Agua	1	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Glucosa (0,2 mM)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1

Se toman 0,4 ml de cada uno de los puntos de la recta patrón o de la muestra y se ponen en otro tubo al que se le añade 1 ml de mezcla enzimática. Se dejan incubar 30 minutos a temperatura ambiente y se mide su absorbancia a 740 nm.

\*Mezcla enzimática: reactivo que contiene un exceso de las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa junto con el sustrato de la peroxidasa (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid, ABTS), en tampón fosfato-tris pH 7.3.

#### Protocolo de preactivación de Amberlita

Para la preactivación de la Amberlita IRC-50 se siguen los siguientes pasos:

- Se pesan 12 g de Amberlita IRC-50 en un tubo de ensayo con rosca.
- Se lava dos veces con agua destilada para eliminar aditivos.
- Se añaden 30 mL de polietilimina 100 mg/mL y se deja en agitación durante 2 horas. Así, este polímero cargado positivamente se une electrostáticamente al soporte con carga negativa.
- Se lava con agua destilada.
- Se añaden 30 mL de glutaraldehído al 2,5% y se deja 30 minutos con agitación. De esta forma, el glutaraldehído sirve de entrecruzador de la polietilamina y del soporte, y se adiciona un brazo espaciador con grupo aldehído capaz de reaccionar con un amino libre de la enzima.
- Se lava con tampón fosfato 50 mM, pH 7

## **Exposición de Resultados**

### *Efecto del pH sobre la actividad de la $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae**

Para analizar el efecto del pH en la actividad de la enzima, se llevó a cabo el ensayo estándar de actividad de  $\beta$ -galactosidasa a una concentración de 100  $\mu$ g/mL varias veces, utilizando tampones fosfato-citrato 40 mM a diferentes pH.

Tras la medición en el laboratorio la absorbancia para cada pH del tampón fosfato, se utilizó la ley de Lambert-Beer para determinar la concentración del producto de la reacción ONP:

$$A = \epsilon C d$$

- A es la absorbancia de la muestra, restándole la del blanco.
- $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar del ONP, que vale 4600  $M^{-1}cm^{-1}$
- C es la concentración de ONP, lo que buscamos calcular.
- d es la longitud atravesada por la luz, que en todos los espectrómetros está normalizada en 1 cm.

El valor de cada concentración de ONP obtenida se multiplicó por el volumen en el que se midió la absorbancia (4 ml). Este resultado se dividió entre el tiempo de reacción (10 min). Por último, este valor se dividió entre la masa (mg) de enzima:

$$m = 100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot 100 \cdot 10^{-3} \text{ml} = 10 \mu\text{g} = 0,01 \text{mg}_{\text{enzima}}$$

El resultado de estas operaciones es la actividad enzimática ( $\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} = \text{U/mg}$ ).

Estos fueron los resultados de actividad obtenidos para cada pH:

pH	absorbancia	Actividad (U/mg)
3	0,531	4
4	0,575	4,3826087
5	0,537	4,05217391
6	0,534	4,02608696
7	0,301	2
8	0,174	0,89565217
9	0,144	0,63478261
10	0,132	0,53043478
Blanco (pH=7)	0,071	

Tabla 1: Valores experimentales de absorbancia y actividad de la  $\beta$ -galactosidasa para cada pH

En la siguiente figura se observa mejor la variación de la actividad con el pH

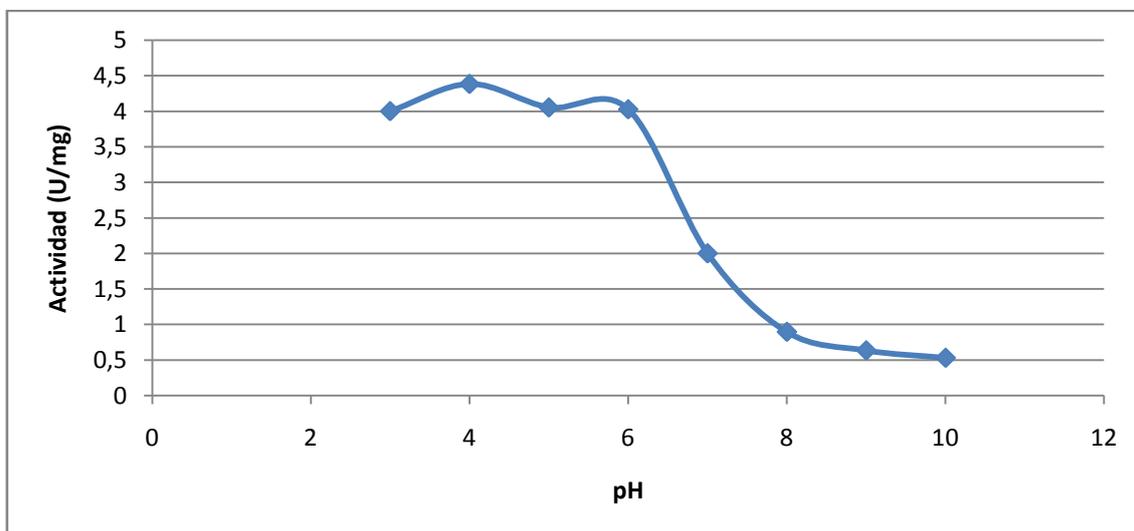


Figura 1: Evolución de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa con respecto al pH.

Se observa que hay un pico a pH 4 donde la actividad es máxima. A partir de ahí, la actividad decrece cuando aumenta el pH, especialmente a partir de pH 6, donde la caída de la actividad es muy notable.

Por tanto, por los datos que se obtuvieron, se puede decir que la enzima  $\beta$ -galactosidasa trabaja bien en un rango de pH de 3 a 6 y su pH óptimo es 4.

#### *Medida de la estabilidad térmica de la enzima*

El experimento consistió en incubar la enzima 100  $\mu\text{g/mL}$  en cuatro baños a distintas temperaturas (40, 60 y 70  $^{\circ}\text{C}$ ), tomando una muestra de cada baño a diferentes tiempos (5, 10, 20, 40 y 60 minutos). También se tomó una muestra sin incubar, es decir, a temperatura ambiente.

A cada una de estas muestras se le aplicó el ensayo estándar de actividad de  $\beta$ -galactosidasa para determinar su absorbancia.

Estos son los datos de absorbancia que se obtuvieron experimentalmente:

tiempo	Absorbancia			
	$T^a=40^{\circ}\text{C}$	$T^a=60^{\circ}\text{C}$	$T^a=70^{\circ}\text{C}$	Blanco ( $T_{\text{amb}}$ )
0	0,501	0,501	0,501	0,077
5	0,457	0,415	0,217	
10	0,487	0,409	0,123	
20	0,481	0,313	0,084	
40	0,426	0,27	0,085	
60	0,441	0,194	0,079	

Tabla 2: datos experimentales de la absorbancia para  $\beta$ -galactosidasa incubada distintos tiempos y a diferentes temperaturas.

Al igual que en el caso del pH, se empleó la ley de Lineweaver-Burk para obtener la concentración de ONP y se siguieron los mismos pasos para determinar la actividad de la enzima, ya que los valores de concentración de enzima (100  $\mu\text{g/mL}$ ), tiempo de reacción (10 min), volumen (4 ml) y miligramos de enzima (0,01) son exactamente iguales. Estos fueron los valores de actividad obtenidos:

tiempo	Actividad (U/mg)		
	$T^a=40^{\circ}\text{C}$	$T^a=60^{\circ}\text{C}$	$T^a=70^{\circ}\text{C}$
0	3,68695652	3,68695652	3,68695652
5	3,30434783	2,93913043	1,2173913
10	3,56521739	2,88695652	0,4
20	3,51304348	2,05217391	0,06086957
40	3,03478261	1,67826087	0,06956522
60	3,16521739	1,0173913	0,0173913

Tabla 3: valores de actividad de la  $\beta$ -galactosidasa incubada distintos tiempos a diferentes temperaturas.

Representando esos datos, queda la siguiente figura:

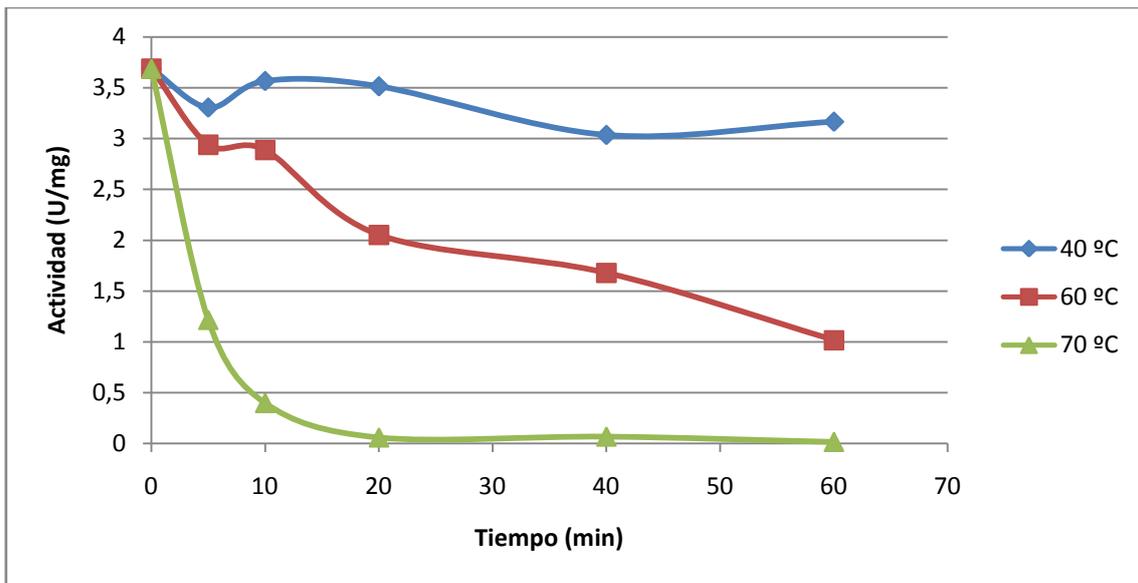


Figura 2: Actividad de la  $\beta$ -galactosidasa con respecto al tiempo y la temperatura de incubación.

Observando la figura se puede deducir que la enzima trabaja mejor a bajas temperaturas, como los 40 °C. A temperaturas altas, como los 70 °C, la enzima se desnaturaliza en pocos minutos y pierde su actividad.

Para determinar el tiempo de vida media, se tuvo cuenta la cinética de la enzima. Se conoce que la velocidad de desactivación es de primer orden con respecto a la concentración de enzima activa:

$$r_d = -dE_a/dt = k_d \cdot E_a$$

Siendo  $k_d$  la constante cinética de desactivación.

Integrando la expresión, resulta:

$$E_a = E_{a0} \cdot e^{-k_d t}$$

Linealizando a través de logaritmos neperianos, queda:

$$\ln(E_a) = -k_d t + \ln(E_{a0})$$

Por tanto, si se representa el logaritmo de la actividad con respecto al tiempo para las tres temperaturas y se efectúa una regresión lineal, la pendiente de la recta coincidirá con la constante de desactivación cambiada de signo

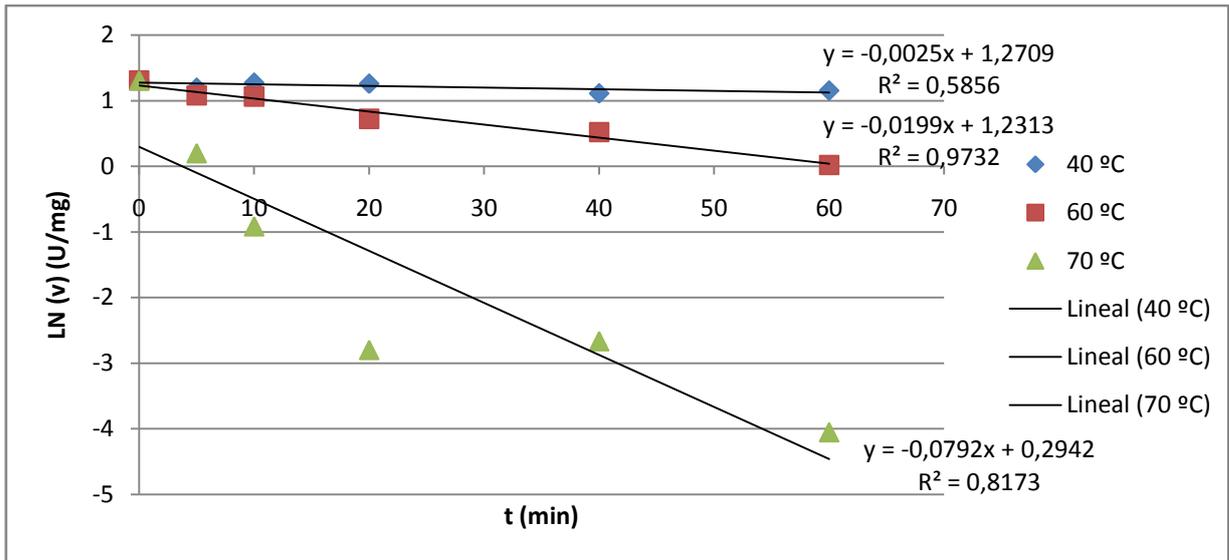


Figura 3: representación del logaritmo de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa frente al tiempo para tres distintas temperaturas de incubación.

Del ajuste lineal de estos puntos se sacaron las ecuaciones de las rectas para cada temperatura:

40°C:  $\ln(v) = -0,0025t + 1,2709$

60°C:  $\ln(v) = -0,0199t + 1,2313$

70°C:  $\ln(v) = -0,0792t + 0,2942$

De donde:

T (°C)	Kd (min <sup>-1</sup> )
40	0,0025
60	0,0199
70	0,0792

Tabla 4: constantes de desactivación de la  $\beta$ -galactosidasa para cada temperatura.

Para calcular el tiempo de vida medio, se sustituye en la ecuación de la velocidad linealizada  $E_a$  por  $E_a/2$ . Operando, queda:

$$t_{\text{medio}} = \ln(2)/k_d$$

T (°C)	T <sub>medio</sub> (min)
40	277,26
60	34,83
70	8,75

Tabla 5: tiempo de vida media de la  $\beta$ -galactosidasa para cada temperatura.

A pesar de que las rectas no se ajustan perfectamente a los puntos, el tiempo medio que se obtuvo tiene sentido, ya que disminuye con la temperatura, al igual que la actividad de la enzima.

### *Determinación de las constantes cinéticas con ONPG como sustrato*

Mediante el ensayo estándar de actividad  $\beta$ -galactosidasa, se realizó una medida de la absorbancia para distintas concentraciones de sustrato ONPG (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1, 5, 10). Además, se llevaron a cabo dos experimentos: uno en presencia de inhibidor (galactosa 30 mM) y otro en ausencia de este. Realmente, la ausencia de inhibidor es imposible, ya que la galactosa es un producto de la reacción de ONPG en presencia de  $\beta$ -galactosidasa. Sin embargo, a tiempos cortos, consideramos que es nula la concentración de inhibidor.

Tras la medición en el laboratorio la absorbancia para cada concentración de ONPG con y sin inhibidor, se utilizó la ley de Lambert-Beer para determinar la concentración del producto de la reacción ONP

El valor de cada concentración de ONP se multiplicó por el volumen en el que se midió la absorbancia (4 ml). Este resultado se dividió entre el tiempo de reacción (10 min). Por último, este valor se dividió entre la masa (mg) de enzima: 0,01 mg

Estos son los valores que se obtuvieron de actividad enzimática para todos los experimentos:

[ONPG](mM)	Abs Blanco	Abs sin inhibidor	Abs con inhibidor 30 mM	Actividad sin inhibidor (U/mg)	Actividad con inhibidor (U/mg)
0,1	0,070	0,120	0,082	0,43478261	0,10434783
0,2	0,073	0,159	0,094	0,74782609	0,1826087
0,4	0,076	0,227	0,112	1,31304348	0,31304348
0,6	0,078	0,290	0,141	1,84347826	0,54782609
1	0,083	0,372	0,165	2,51304348	0,71304348
5	0,103	0,744	0,387	5,57391304	2,46956522
10	0,121	0,913	0,563	6,88695652	3,84347826
20	0,152	1,027	0,781	7,60869565	5,46956522

Tabla 6: Valores de actividad enzimática a partir de la absorbancia para distintas concentraciones de sustrato, con y sin inhibidor

A continuación, se representa la actividad frente a la concentración de sustrato:

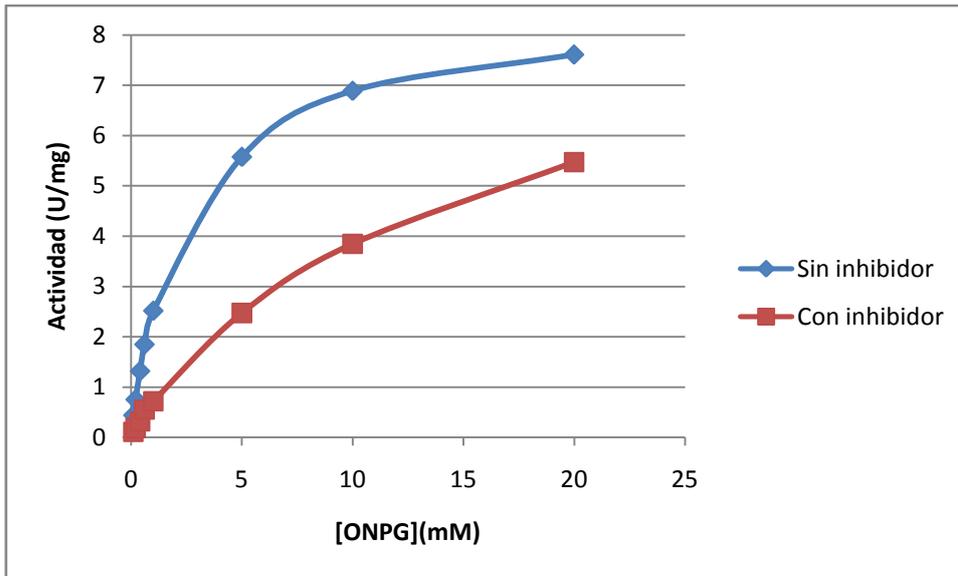


Figura 4: Representación de la actividad con respecto a la concentración de ONPG. Se puede observar que se asemeja al modelo de Michaelis-Menten.

Para determinar el valor de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$ , se utilizó la regresión no lineal, ya que es más precisa y avanzada que otros métodos como la linealización de Lineweaver-Burk, la linealización de Hanes o la regresión lineal.

Además si se cuenta con un software adecuado, también es más sencillo. En este caso se usó el Mystat. Se introdujeron los datos de la tabla y la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_o = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Estos son los resultados que se obtuvieron:

### Ausencia de inhibidor

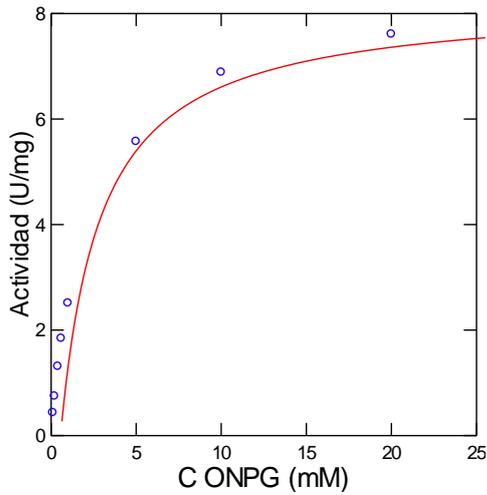


Figura 5: Regresión no lineal de los datos de concentración de sustrato y actividad en ausencia de inhibidor, utilizando la ecuación de Michaelis-Menten.

La estimación de  $K_m$  y  $V_{max}$  que nos ofrece el programa son:

$$V_{max} = 8,412 \text{ U/mg}$$

$$K_m = 2,301 \text{ mM}$$

### Con Inhibidor

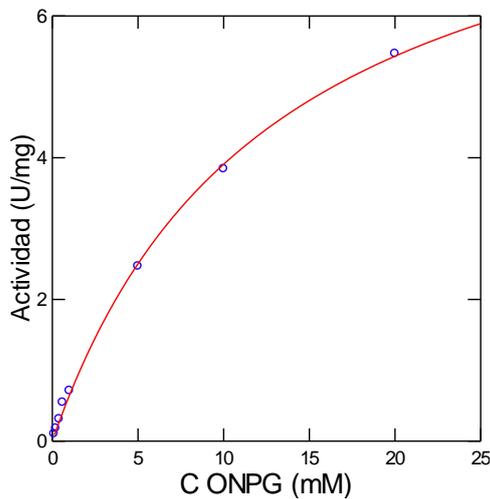


Figura 6: Regresión no lineal de los datos de concentración de sustrato y actividad en presencia de inhibidor (galactosa 30 mM), utilizando la ecuación de Michaelis-Menten.

Los datos de  $K_m$  y  $V_{max}$  que el software obtuvo por estimación fueron:

$$K_m = 12,806 \text{ mM}$$

$$V_{max} = 8,91 \text{ U/mg}$$

Por tanto, en resumen, los resultados de las constantes cinéticas fueron;

	Vmax (U/mg)	Km (mM)
Sin inhibidor	8,412	2,301
Con inhibidor	8,91	12,806

Tabla 7: Valores de las constantes cinéticas obtenidos con y sin inhibición

Para averiguar qué tipo de inhibición se da, se compararon estos valores. Se puede observar que la Vmax es muy parecida, solo aumenta un poco con la inhibición, y el valor de Km sí que es mucho mayor en el caso de la inhibición. Este hecho característico indica claramente que se trata de una inhibición competitiva, lo que quiere decir que el inhibidor competirá por los mismos sitios activos que el sustrato, impidiendo que se dé la reacción correctamente.

Sabiendo esto se pudo determinar otro parámetro interesante como es la constante de inhibición Ki:

$$K_{m_{ap}} = \alpha K_m$$

Donde,

$K_{m_{ap}}$  es la Km con inhibidor

$K_m$  es la km sin inhibidor

$$\alpha = 12,806/2,301 = 5,565$$

$$\alpha = 1 + [I]/K_i$$

Donde,

[I] es la concentración del inhibidor, de 30 mM

$$K_i = [I]/(\alpha - 1) = 30/(5,565 - 1) = 6,572 \text{ mM}$$

Por último, es necesario conocer el valor de la constante de especificidad  $K_{cat}/K_m$ , que cuanto mayor sea, mayor será la eficiencia de la enzima. En primer lugar, se calculó  $K_{cat}$ :

$$V_{max} = K_{cat} \cdot \text{Cenzima}$$

La concentración de enzima de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Se pasó a mM, teniendo en cuenta que la masa molecular de la  $\beta$ -galactosidasa proveniente de *Aspergillus oryzae* es de 105000  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$  [7]:

$$100 \mu\text{g/ml} / 105000 \mu\text{g}/\mu\text{mol} = 9,523 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/ml}$$

- Por tanto, para el caso sin inhibición:

$$V_{\max} = 8,412 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \cdot 0,01 \text{ mgenzima} \cdot \frac{1}{4 \text{ ml}} = 0,02103 \mu\text{mol/mLmin}$$

$$K_{\text{cat}} = \frac{0,02103 \mu\text{mol/mLmin}}{9,523 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/ml}} = 22,08 \text{ min}^{-1}$$

- Para el caso con inhibición:

$$V_{\max} = 8,91 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \cdot 0,01 \text{ mgenzima} \cdot \frac{1}{4 \text{ ml}} = 0,02227 \mu\text{mol/mLmin}$$

$$K_{\text{cat}} = \frac{0,02227 \mu\text{mol/mLmin}}{9,523 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/ml}} = 23,391 \text{ min}^{-1}$$

En esta tabla están recogidas todas las constantes cinéticas que se determinaron:

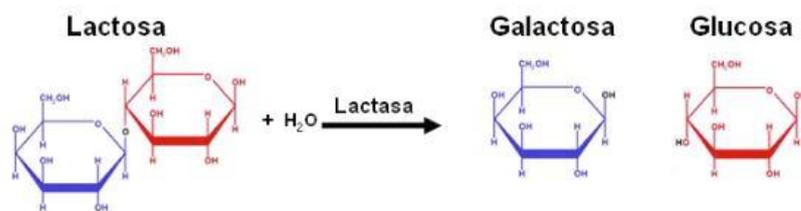
	Sin inhibidor	Con inhibidor (galactosa 30 mM)
Km (mM)	2,301	12,806
Vmax (U/mg)	8,412	8,91
Kcat (min <sup>-1</sup> )	22,08	23,391
Kcat/Km (min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	9,596	1,827
Ki (mM)		6,572

Tabla 8: valores de las constantes cinéticas (con y sin inhibición) obtenidas con ONPG como sustrato mediante el ensayo estándar de actividad β-galactosidasa.

Como era de esperar, el valor de la constante de especificidad es mayor en el caso sin inhibición, lo que indica que la reacción será más rápida en ausencia de galactosa.

#### *Determinación de las constantes cinéticas con lactosa como sustrato*

En este experimento se calcularon, al igual que en el anterior, las constantes cinéticas de la enzima, solo que usando lactosa en lugar de ONPG como sustrato. A 2,8 ml de disolución de distintas concentraciones de lactosa se le añadieron 0,2 ml de β-galactosidasa, poniéndose en marcha la reacción:



De cada disolución reaccionando se tomaron muestras a las que se les aplicó el método de glucosa oxidasa-peroxidasa. También se preparó una recta patrón tal y como indica el protocolo.

En primer lugar, se representó la recta patrón (absorbancia frente a concentración de glucosa).

Para la concentración de glucosa, se utilizó la siguiente fórmula:

$$c_0 \cdot v_0 = c_f \cdot v_f$$

Donde,

- $c_0$  es la concentración inicial de glucosa, en nuestro caso 0,2 mM.
- $v_0$  es el volumen de glucosa, que va variando desde 0 hasta 1ml
- $c_f$  es la concentración de glucosa que queremos calcular.
- $v_f$  es el volumen de disolución (agua+glucosa) que siempre es de 1 ml

Por tanto:

$$[\text{Glucosa}] = (0,2V_{\text{glucosa}})/1$$

Teniendo en cuenta los datos experimentales de absorbancia y estos cálculos, realizamos la siguiente tabla:

Tubo	V <sub>Glucosa</sub> (ml)	[Glucosa] (mM)	Absorbancia (740nm)	Absorbancia(740 nm) real
Blanco	0	0	0,081	0
1	0,1	0,02	0,286	0,205
2	0,2	0,04	0,482	0,401
3	0,4	0,08	0,821	0,74
4	0,6	0,12	1,171	1,09
5	0,8	0,16	1,542	1,461
6	1	0,2	1,862	1,781

Tabla 9: Datos de concentración de glucosa y absorbancia para los puntos de la recta patrón.

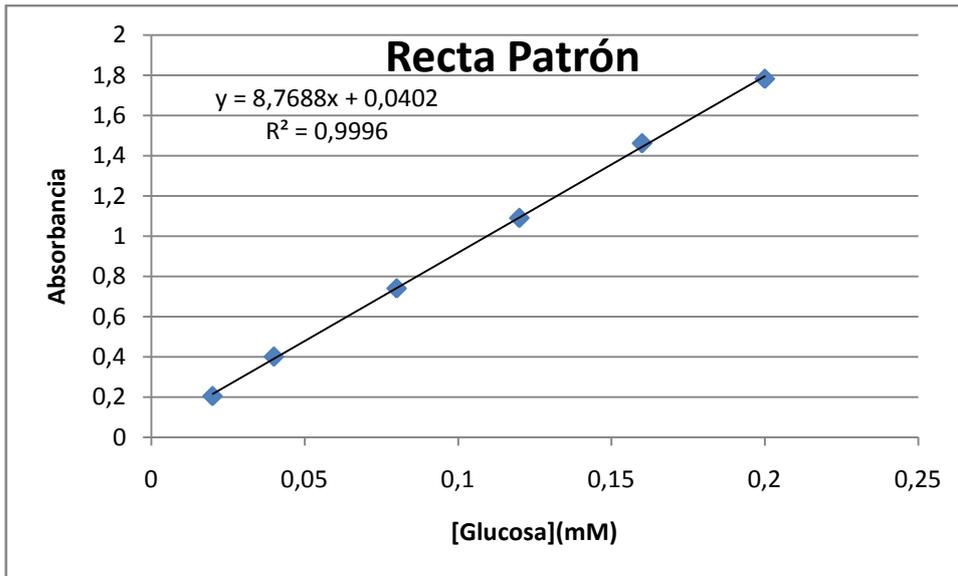


Figura 7: Representación de la absorbancia frente a la concentración de glucosa para los puntos de la recta patrón.

Ajustando linealmente los puntos, esta es la recta que se obtuvo:

$$\text{Abs} = 8,7688[\text{G}]+0,0402$$

Esta ecuación se utilizaría posteriormente con los datos tomados para las distintas muestras. En primer lugar, estos fueron los datos recogidos en el laboratorio:

Tiempo (min)	Absorbancia				Dilución
	100 mM	70 mM	40 mM	20 mM	
5	1,24	1,268	1,226	1,138	Dil: 1/40
10	1,03	1,007	0,954	0,846	Dil: 1/100
20	1,851	1,775	1,6	1,281	Dil 1/100
40	1,692	1,564	1,299	0,902	Dil 1/200
60	1,193	1,07	0,836	0,544	Dil 1/400
Blanco:	0,077	0,077	0,077	0,077	

Tabla 10: Absorbancias medidas en el laboratorio para las distintas muestras con su correspondiente dilución.

Mediante la ecuación de la recta anterior y teniendo en cuenta las diluciones (si es 1/40, la concentración de glucosa calculada se multiplica por 40, por ejemplo), se calcularon las concentraciones de glucosa de cada una de las muestras:

	[G](mM)				
Tiempo (min)	100 mM	70 mM	40 mM	20 mM	Dilución
5	5,12179546	5,24952103	5,05793267	4,656509443	Dil: 1/40
10	10,4096342	10,1473406	9,54292492	8,311285467	Dil: 1/100
20	19,7723748	18,9056655	16,9099535	13,27205547	Dil 1/100
40	35,9182556	32,998814	26,9546574	17,89982666	Dil 1/200
60	49,0739896	43,4631877	32,7889791	19,46902655	Dil 1/400

Tabla 11: Concentraciones de glucosa relativas a distintas concentraciones iniciales de lactosa y el tiempo de duración de cada reacción.

Por último, como la relación estequiométrica entre la lactosa y la glucosa en la reacción es 1:1, la conversión se puede definir como la relación entre la concentración de glucosa al final de la reacción y la de lactosa al principio de la misma

$$x = \frac{[Glucosa]}{[Lactosa]_0}$$

Estos fueron los resultados obtenidos:

	CONVERSION			
Tiempo (min)	100 mM	70 mM	40 mM	20 mM
5	0,051217955	0,07499316	0,12644832	0,23282547
10	0,104096342	0,14496201	0,23857312	0,41556427
20	0,197723748	0,27008094	0,42274884	0,66360277
40	0,359182556	0,47141163	0,67386644	0,89499133
60	0,490739896	0,62090268	0,81972448	0,9604783

Tabla 12: Conversión de la reacción que genera glucosa y galactosa a partir de lactosa para distintas concentraciones de esta y diferentes tiempos.

Representando estos datos:

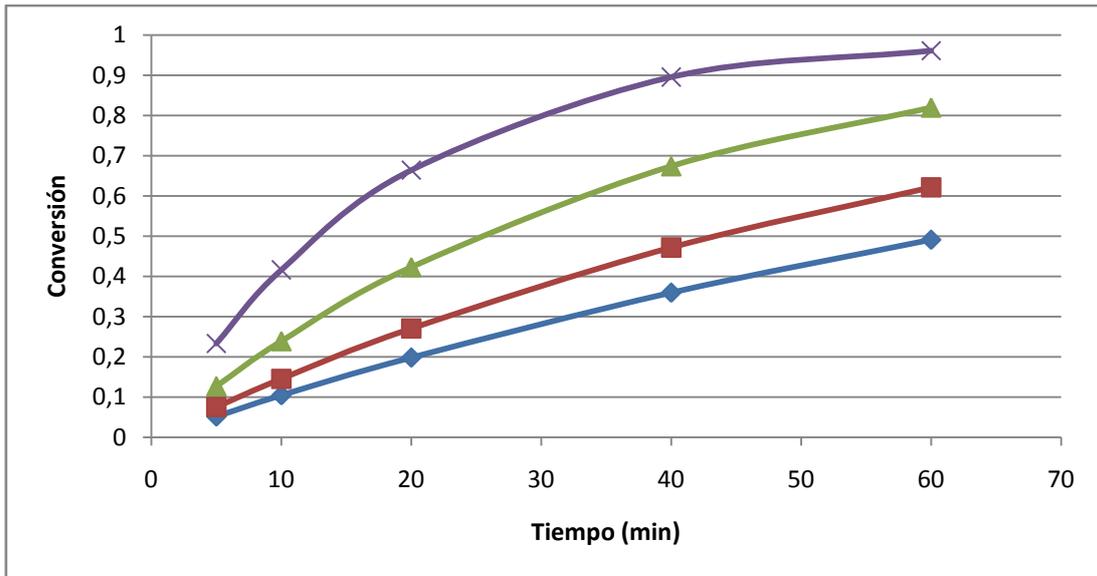


Figura 8: Representación de la conversión frente al tiempo para distintas concentraciones iniciales de lactosa.

A la vista de esta figura, se observa que cuanto menor es la concentración de lactosa al principio, mayor será la conversión. Además, como era de esperar, cuanto más tiempo transcurre, más conversión se alcanza.

Con el objetivo de hallar las constantes cinéticas, se tuvo en cuenta que la galactosa, que es producto de la reacción, es un inhibidor competitivo de la misma. Por ello, se empleó la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = \frac{dS}{dt} = \frac{E_0 k_2 [S]}{K_m \left( 1 + \frac{[P]}{K_i} \right) + [S]}$$

Integrándola, obtenemos la expresión:

$$t = A \cdot x - B \cdot \ln(1 - x)$$

Donde A y B se definen como:

$$A = \left( 1 - \frac{K_m}{K_i} \right) \cdot \left( \frac{S_0}{V_m} \right)$$

$$B = \left( 1 + \frac{S_0}{K_i} \right) \cdot \left( \frac{K_m}{V_m} \right)$$

Por tanto, teniendo en cuenta los datos obtenidos de tiempo y concentración, se realizó una regresión no lineal con el programa Mystat usando la ecuación integrada anterior. De esta forma, se pudo obtener el valor de A y B para cada concentración de lactosa.

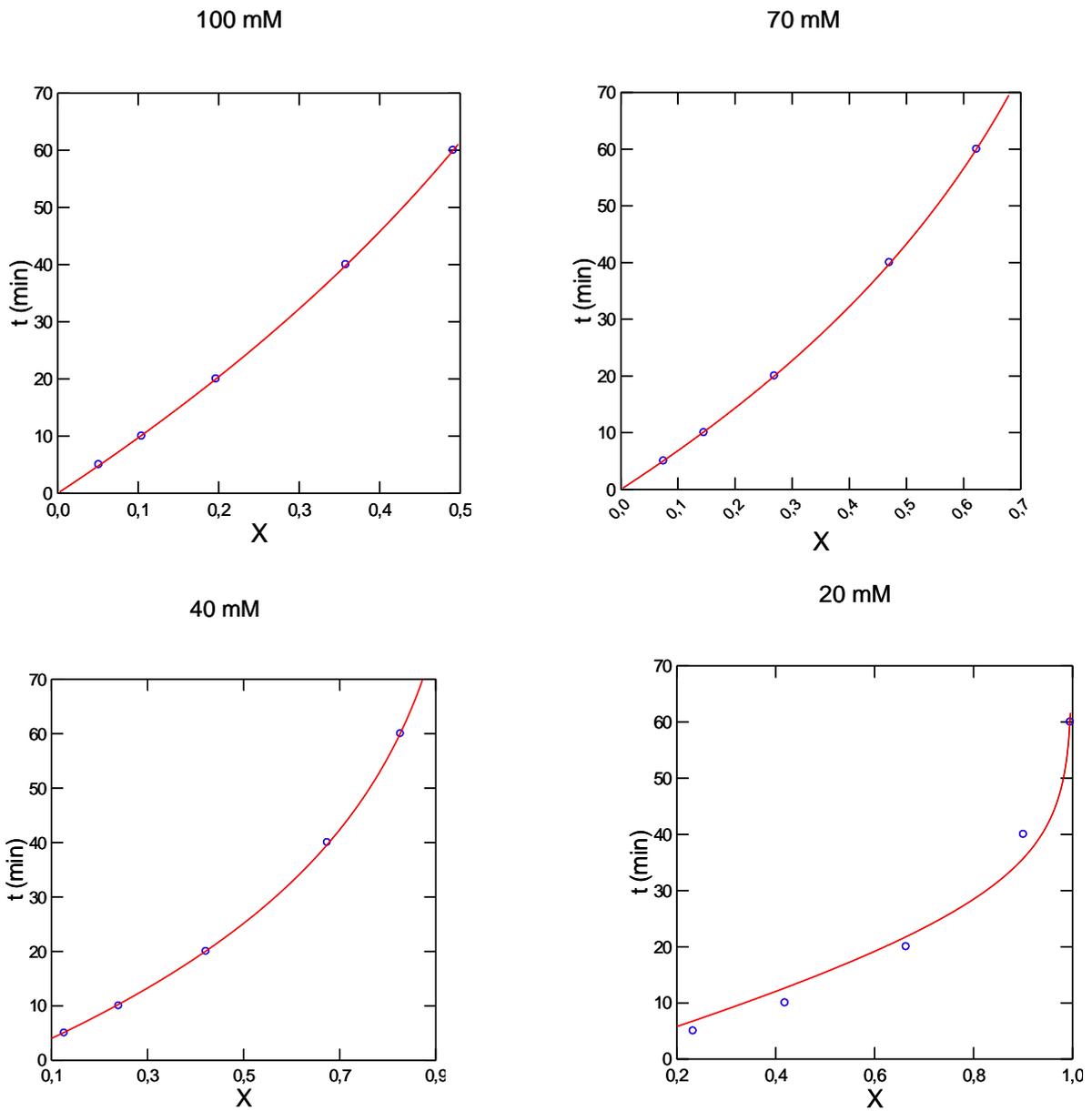


Figura 9: Regresiones no lineales para los datos de concentración y tiempo de distintas concentraciones de lactosa.

De las regresiones se obtuvieron los siguientes valores:

	100	70	40	20
A (min)	11,815	7,806	4,754	1,814
B (min)	80,325	56,884	32,767	17,379

Tabla 13: Valores de A y B para distintas concentraciones de lactosa.

Como los parámetros A y B están relacionados con las constantes cinéticas, para hallarlas se hizo la suma  $A+B$ , obteniéndose:

$$A + B = \frac{S_0}{V_m} - \frac{K_0 S_0}{K_i V_m} + \frac{K_m}{V_m} + \frac{K_0 S_0}{K_i V_m}$$

Simplificando:

$$A + B = \frac{1}{V_m} S_0 + \frac{K_m}{V_m}$$

Si se representa A+B frente a  $S_0$ , la pendiente de la recta será  $1/V_{m\acute{a}x}$  y la ordenada en el origen,  $K_m/V_{m\acute{a}x}$ .

$S_0$ (mM)	A+B (min)
20	19,193
40	37,521
70	64,69
100	92,14

Tabla 14: Valores de A+B para cada concentración de lactosa.

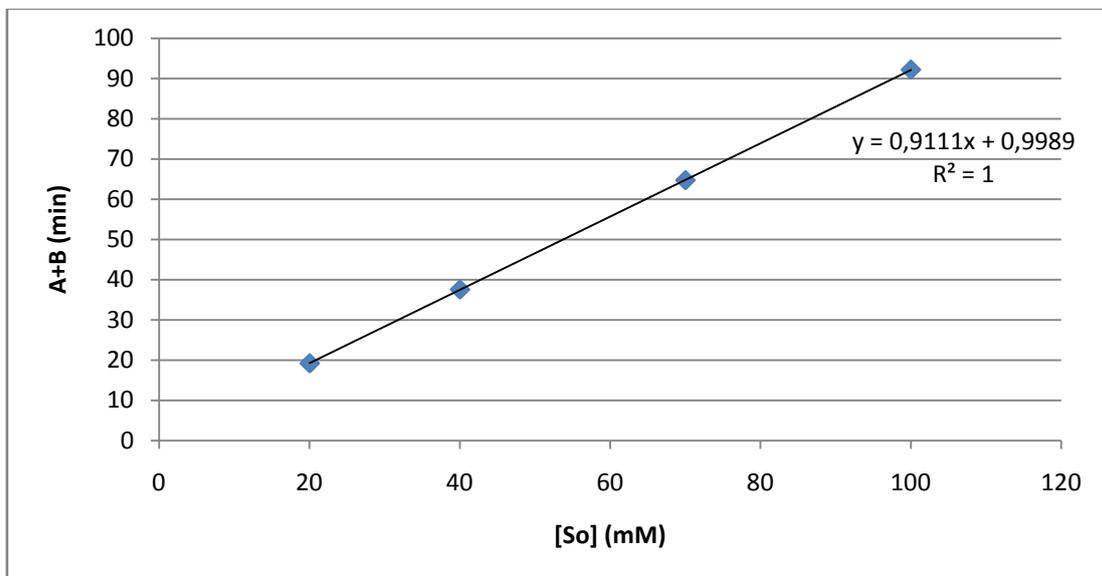


Figura 10: Representación gráfica de A+B frente a la concentración de lactosa y regresión lineal de los puntos.

Del ajuste por mínimos cuadrados se obtiene que la ecuación de la recta es:

$$A + B = 0,9111 \cdot S_0 + 0,9989$$

Por consiguiente:

$$V_{m\acute{a}x} = 1/0,9111 = 1,098 \text{ mM/min}$$

Sabiendo que la concentración de  $\beta$ -galactosidasa es de 3000 mg/L, la  $V_{max}$  (U/mg) resulta:

$$V_{\text{máx}} = \frac{1098 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{min}}}{3000 \frac{\text{mg}}{\text{L}}} = 0,366 \text{ U/mg}$$

$$\frac{K_m}{V_m} = 0,9989; K_m = 1,0967 \text{ mM}$$

Tras esto, se pudo calcular la constante catalítica  $K_{\text{cat}}$ , que se relaciona con  $V_{\text{máx}}$  mediante la ecuación:

$$V_{\text{max}} = K_{\text{cat}} \cdot \text{Cenzima}$$

La concentración de enzima de 3 mg/ml.

Se pasó a mM, teniendo en cuenta que la masa molecular de la  $\beta$ -galactosidasa proveniente de *Aspergillus oryzae* es de 105000 mg/mmol:

$$3 \text{ mg/ml} / 105000 \text{ mg/mmol} = 0,0286 \text{ mmol/L}$$

Por tanto:

$$K_{\text{cat}} = \frac{1,098 \text{ mmol/Lmin}}{0,0286 \text{ mmol/L}} = 38,43 \text{ min}^{-1}$$

Por último, se calculó la constante de inhibición  $K_i$ , sustituyendo en la ecuación del parámetro A (es indiferente hacerlo en esta o en la de B).

$$K_i (20\text{mM lactosa}) = \frac{K_m}{1 - A \frac{V_{\text{max}}}{S_0}} = \frac{1,0967\text{mM}}{1 - 1,814\text{min} \frac{1,098\text{mM}/\text{min}}{20\text{mM}}} = 1,218 \text{ mM}$$

$$K_i (40\text{mM lactosa}) = 1,261 \text{ mM}$$

$$K_i (70\text{mM lactosa}) = 1,249 \text{ mM}$$

$$K_i (100\text{mM lactosa}) = 1,26 \text{ mM}$$

Haciendo una media:

$$K_i = 1,247 \text{ mM}$$

En la siguiente tabla se indica un resumen de las constantes obtenidas:

Km (mM)	1,0967
Vmax (U/mg)	0,366
Kcat (min <sup>-1</sup> )	38,43
Kcat/Km (min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	35,04
Ki (mM)	1,247

Tabla 15: Valores de los parámetros cinéticos de la β-galactosidasa determinados utilizando lactosa como sustrato.

### *Inmovilización de la enzima en Amberlita IRC-50*

En este experimento se tuvo como objetivo poner en contacto β-galactosidasa con Amberlita para que esta absorbiera a la enzima y calcular consecuentemente el porcentaje de enzima inmovilizada en la resina.

Al igual que en los casos anteriores en los que se utilizó ONPG para determinar la actividad de la enzima, se siguieron los mismos pasos para pasar de la absorbancia medida a la actividad. Se aplica la ley de Lambert-Beer para calcular la concentración de ONP. Además, el volumen en el que se ha medido la absorbancia y el tiempo de reacción son iguales que en los casos anteriores (los valores que da el protocolo del ensayo estándar). Se tuvo también en cuenta la masa de enzima, que en este caso es:

$$\text{Concentración de enzima} = \frac{3 \text{ mg/ml}}{7,5 \text{ dilución}} = 0,4 \text{ mg/ml}$$

$$m_{\text{enzima}} = 0,4 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \cdot 100 \cdot 10^{-3} \text{ ml} = 0,04 \text{ mg}_{\text{enzima}}$$

Por tanto, los datos obtenidos fueron:

Tiempo (min)	Abs	v (U/mg)
0	1,610	3,280
5	0,777	1,470
10	0,369	0,583
20	0,281	0,391
40	0,307	0,448
60	0,300	0,433
80	0,336	0,511
Blanco	0,101	

Tabla 16: actividad para cada muestra (dilución 1/7,5) de β-galactosidasa en amberlita.

En la tabla se observa que conforme aumenta el tiempo de incubación de la enzima con amberlita, la actividad es menor, lo que indica que la  $\beta$ -galactosidasa se va inmovilizando cada vez más en la resina.

Para calcular de forma exacta el porcentaje de enzima inmovilizado, se recurrió a la siguiente ecuación:

$$\%enzima\ inmovilizada = \frac{v_0 - v_i}{v_0}$$

Donde:

$v_0$  es la actividad de la enzima a tiempo cero (3,280 U/mg)

$v_i$  es la actividad de la enzima en cada tiempo

Tiempo (min)	v (U/mg)	%inmovilizado
0	3,280	0
5	1,470	0,55202121
10	0,583	0,82239894
20	0,391	0,88071571
40	0,448	0,86348575
60	0,433	0,86812459
80	0,511	0,84426773

Tabla 17: porcentaje de  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada en amberlita para cada tiempo.

Representando estos datos:

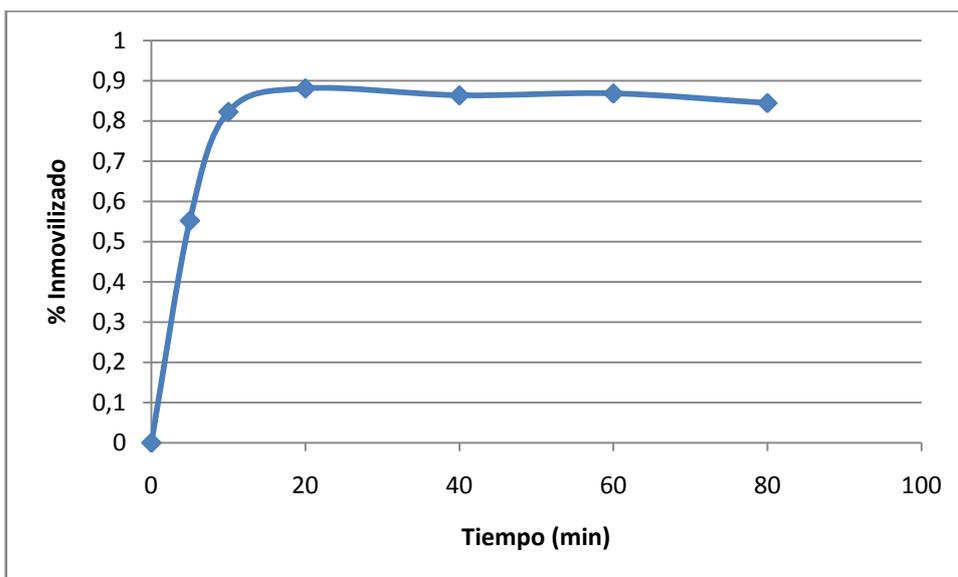


Figura 11: representación del porcentaje de enzima inmovilizada en amberlita con respecto al tiempo de incubación con agitación.

Observando la figura, se puede deducir que la inmovilización se estabiliza a los 20 minutos. A partir de ese tiempo no se inmoviliza más y la curva se vuelve relativamente constante, con algunos altibajos debidos probablemente a errores experimentales.

Se tomó como dato de porcentaje inmovilizado la media de los valores que se obtuvieron a partir de 20 minutos, es decir: 86,41%

Por consiguiente, la cantidad de enzima inmovilizada en la amberlita se determinó de la siguiente manera:

$$mg_{enzima} = 3 \text{ mg/ml} \cdot 30 \text{ ml} = 90 \text{ mg}$$

$$\text{Enzima inmovilizada} = 0,8641 \cdot 90 = 77,77 \text{ mg}$$

$$\text{Concentración de enzima inmovilizada en la resina} = 77,77 \text{ mg} / 20 \text{ ml} = 3,89 \text{ mg/ml}$$

En resumen:

% enzima inmovilizada	Enzima inmovilizada (mg)	Concentración (mg/ml)
86,41	77,77	3,89

Tabla 18: porcentaje, masa y concentración de  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada en amberlita

#### *Porosidad de la amberlita*

Para determinar la porosidad de la amberlita, se midió la absorbancia a 410 nm de una disolución de 2 ml de ONP 2mM, 2 ml de esa disolución añadidos a 2 ml de amberlita y, por último, la absorbancia de agua para usarla como blanco.

	Abs	Abs real
ONP	0,509	0,422
ONP+Amberlita	0,375	0,288
Agua (Blanco)	0,087	

Tabla 19: Absorbancia de cada muestra.

Para calcular el volumen ocupado por ONP + Amberlita, se utilizó la ecuación:

$$Abs_1 \cdot V_1 = Abs_2 \cdot V_2$$

$$0,422 \cdot 2 = 0,288 \cdot V_2 ; V_2 = 2,9305 \text{ ml.}$$

Restándole el volumen de ONP:

$$V_{\text{huecos}} = 0,9305 \text{ ml.}$$

Dividiendo entre los 2 ml de resina, obtenemos finalmente la porosidad de la amberlita

$$\text{Porosidad} = 0,465$$

### Hidrólisis de lactosa en el biorreactor

Se virtió en una columna de 20 ml la amberlita preparada anteriormente conteniendo la  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada y se le añadió tampón fosfato pH 4,5 para evitar que se secase el gel.

Ya en ausencia de tampón, se hicieron pasar a través de la columna distintos caudales de suero lactosado a distintas concentraciones (5, 10, 20 y 50 mM). A la salida se diluyeron las muestras obtenidas y se aplicó el método de glucosa oxidasa-peroxidasa para medir las concentraciones de glucosa obtenidas.

Con el objetivo de calcular las constantes cinéticas de la enzima inmovilizada, se siguió el mismo procedimiento que en el experimento anterior "*determinación de las constantes cinéticas con lactosa como sustrato*".

Se construyó una recta patrón a partir de los datos experimentales:

Tubo	Abs	[G] (mM)	Abs real
Blanco	0,083	0	0
1	0,27	0,02	0,187
2	0,499	0,04	0,416
3	0,821	0,08	0,738
4	1,134	0,12	1,051
5	1,497	0,16	1,414
6	1,853	0,2	1,77

Tabla 20: Datos de concentración de glucosa y absorbancia la recta patrón.

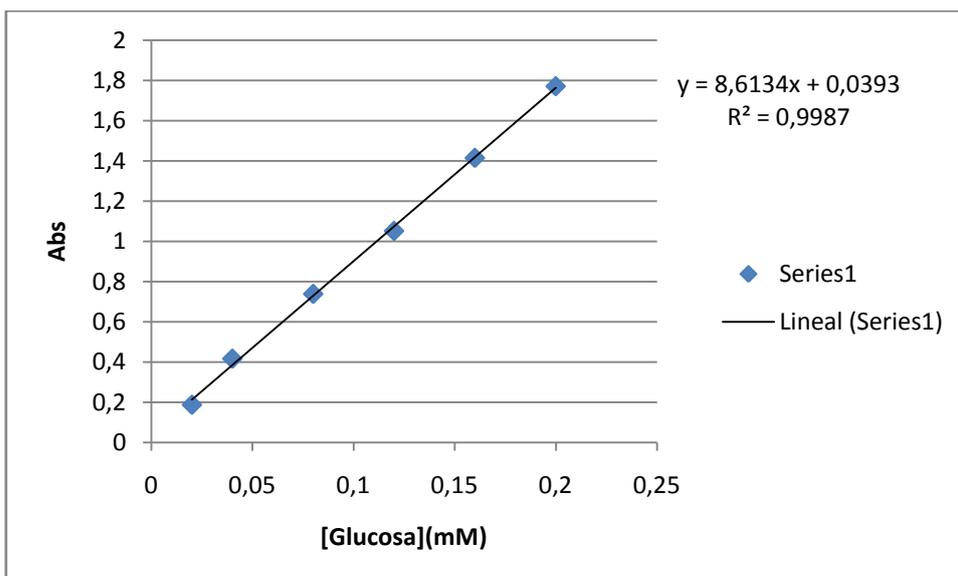


Figura 12: recta patrón, que expresa la absorbancia con respecto a la concentración de glucosa.

Mediante un ajuste lineal, se obtiene una ecuación que relaciona la absorbancia con la concentración de glucosa:

$$\text{Abs} = 8,6134[\text{G}] + 0,0393$$

Utilizándola, se pudieron calcular las concentraciones de glucosa para los datos de absorbancia medidos mediante el método glucosa oxidasa-peroxidasa.

[S <sub>0</sub> ] (mM)	50	20	10	5	
Caudal (ml/min)	Abs				Dilución
13,3	0,822				1/200
9,1	1,068				1/200
4,5	1,117				1/300
2,3	1,416				1/300
12,9		0,566			1/200
9,4		0,666			1/200
4,3		0,635			1/300
3,7		0,653			1/300
14,7			0,371		1/200
8			0,466		1/200
4,1			0,397		1/300
3			0,405		1/300
13				0,272	1/200
7,7				0,309	1/200
4,9				0,26	1/300
2,9				0,265	1/300

Tabla 21: datos de absorbancia a la salida de la columna para cada caudal y concentración de lactosa.

Aplicando la ecuación de la recta patrón y teniendo en cuenta las diluciones:

S <sub>0</sub> (mM)	50	20	10	5
Caudal (ml/min)	[Glucosa] (mM)			
13,3	16,2467783			
9,1	21,9588084			
4,5	34,6448557			
2,3	45,0588618			
12,9		10,3025518		
9,4		12,6245153		
4,3		17,8570599		
3,7		18,4839901		
14,7			5,77472311	
8			7,98058839	
4,1			9,56765041	
3			9,84628602	
13				3,47597929
7,7				4,33510577
4,9				4,79601551
2,9				4,97016277

Tabla 22: Concentraciones de glucosa a la salida de la columna para cada caudal y concentración inicial de lactosa.

A partir de estos datos, la conversión se calcula fácilmente sabiendo que:

$$x = \frac{[Glucosa]}{[Lactosa]_0}$$

Por otro lado, para el cálculo del tiempo de residencia, se debe recurrir a la ecuación:

$$t = \frac{V_{exclusi\acute{o}n}}{Caudal}$$

Para calcular el volumen de exclusión, es decir, el volumen que queda entre las partículas de amberlita, se ha de multiplicar la porosidad de la amberlita por el volumen del bioreactor:

$$V_{exclusi\acute{o}n} = 0,465 \cdot 20 = 9,3 \text{ ml.}$$

De esta forma, se determinó el tiempo de residencia correspondiente a cada caudal.

S <sub>0</sub> mM	50	20	10	5	
Caudal (ml/min)	CONVERSIÓN				t(min)
13,3	0,32493557				0,69966583
9,1	0,43917617				1,02258852
4,5	0,69289711				2,06790123
2,3	0,90117724				4,04589372
12,9		0,51512759			0,7213609
9,4		0,63122576			0,98995272
4,3		0,892853			2,16408269
3,7		0,9241995			2,51501502
14,7			0,57747231		0,63303099
8			0,79805884		1,16319444
4,1			0,95676504		2,2696477
3			0,9846286		3,10185185
13				0,69519586	0,71581197
7,7				0,86702115	1,20851371
4,9				0,9592031	1,89909297
2,9				0,99403255	3,20881226

Tabla 23: conversión y tiempo de residencia para cada caudal y concentración de lactosa.

Sirviéndose de la ecuación integrada de la velocidad para el caso con inhibición competitiva (galactosa):

$$t = A \cdot x - B \cdot \ln(1 - x)$$

Se realizó una regresión no lineal con el programa MyStat con los datos de tiempo y conversión, obteniéndose valores para A y B:

[S <sub>0</sub> ] (mM)	50	20	10	5
A (min)	0,046	0,066	0,025	0,013
B (min)	1,73	0,948	0,718	0,598
A+B	1,776	1,014	0,743	0,611

Tabla 24: valores de A y B obtenidos por regresión no lineal de la anterior ecuación mediante el MyStat y su suma.

Teniendo en cuenta, al igual que en "*determinación de las constantes cinéticas con lactosa como sustrato*" que:

$$A + B = \frac{1}{V_m} S_0 + \frac{K_m}{V_m}$$

Representamos A+B respecto a la concentración de lactosa para así obtener las constantes cinéticas:

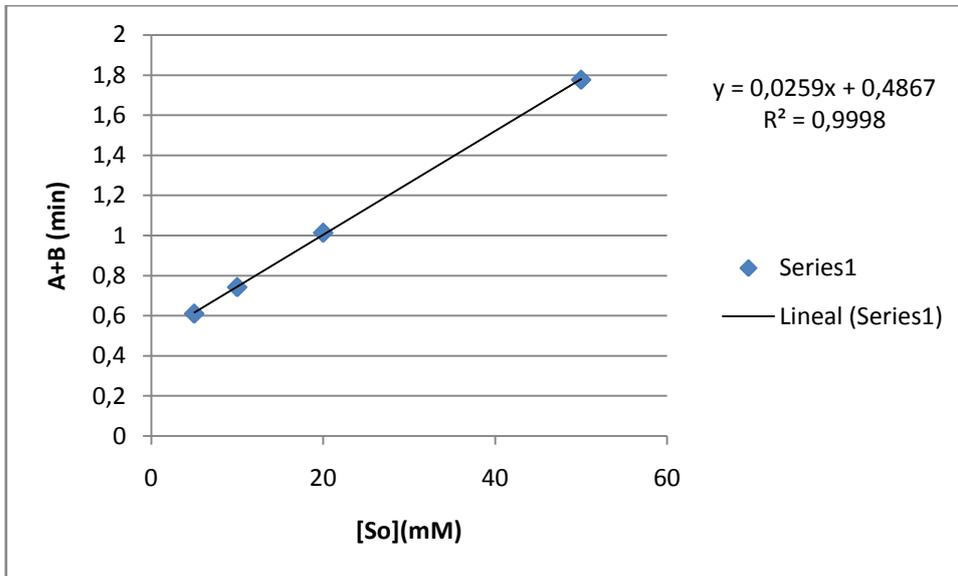


Figura 13: Representación gráfica de A+B frente a la concentración de lactosa y regresión lineal de los puntos.

La ecuación de la recta resulta:

$$A+B = 0,0259 \cdot [So] + 0,4867$$

Directamente a partir de la pendiente y la ordenada en el origen se pueden obtener  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$ .

Despejando de la ecuación de A,  $K_i$  queda expresada como:

$$K_i = \frac{K_m}{1 - A \frac{V_{max}}{S_o}}$$

Calculamos la  $K_i$  para cada concentración de lactosa y hacemos la media.

Conociendo la concentración de enzima calculada en el apartado anterior (3,89 mg/ml), se pudo obtener asimismo la constante catalítica.

Por consiguiente, los parámetros cinéticos de la  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada en amberlita son:

Vmax (mM/min)	38,6100386
Vmax (U/mg)	9,929
Km (mM)	18,7915058
Ki(mM)	20,492
Kcat (min <sup>-1</sup> )	1042,17
Kcat/Km (mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	55,46

Tabla 25: constantes cinéticas de la  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada en amberlita.

Una vez conocidos los parámetros cinéticos de la enzima inmovilizada, se procedió a simular la actividad del biorreactor mediante el programa Berkeley Madonna. Los 16 caudales experimentales se agruparon en 4 para simplificar la tarea, asumiendo que el error cometido era pequeño y tomando como valor el caudal medio de cada grupo.

Para poner en marcha el software se le introdujeron los datos de los parámetros Km (mM), Vmax (mM/min) y Ki (mM), el volumen de exclusión (9,3 ml) y los distintos caudales (ml/min) y concentraciones iniciales de lactosa (mM) para cada caso. En la siguiente figura se muestra un ejemplo de la respuesta que ofreció el programa, para el caso de una concentración de lactosa de 50 mM y un caudal de 2,975 ml/min

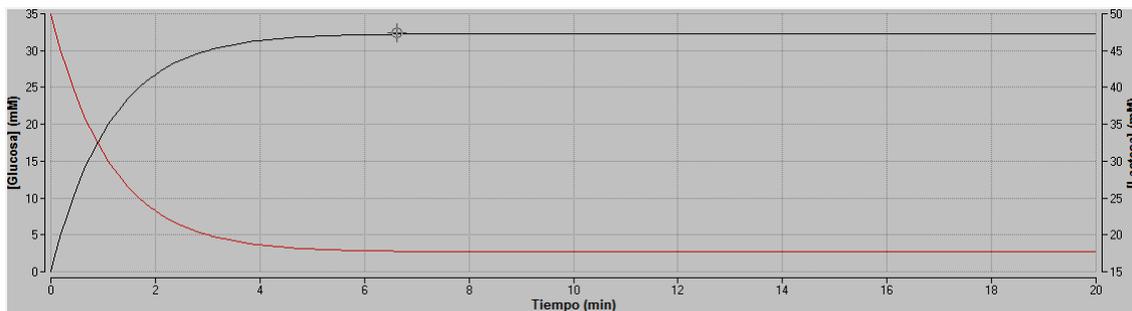


Figura 14: Simulación del biorreactor con el programa Berkeley-Madonna para una concentración inicial de lactosa de 50 mM y un caudal de 2,975 ml/min.

De la figura se deduce que la concentración máxima de glucosa fue de 32,38 mM, alcanzada en un tiempo de 6,64 minutos. De la misma manera se llevó a cabo la simulación para el resto de caudales y concentraciones de lactosa, obteniéndose unas concentraciones de glucosa y unos tiempos que se muestran en la siguiente tabla:

[S0] (mM)	50	20	10	5
Caudal (ml/min)	[Glucosa](mM) (t(min))			
2,975	32,38 (6,64)	15,28 (5)	8,1255 (4,63)	4,19 (4,2)
4,45	27,4 (6,361)	13,64 (4,8)	7,417 (4,43)	3,882 (3,43)
8,55	19,22 (4,158)	10,51 (3,73)	5,976 (3,189)	3,204 (2,59)
13,475	14,14 (3,773)	8,22 (3,71)	4,843 (2,6)	2,652 (2,141)

Tabla 26: Concentraciones de lactosa y tiempo necesario para alcanzarlas en el caso de cada caudal y cada concentración inicial de lactosa obtenidas en un biorreactor simulado con el programa Berekeley-Madonna.

Con estos datos se pudo determinar la conversión obtenida:

[S0] (mM)	50	20	10	5
Caudal (ml/min)	CONVERSIÓN			
2,975	0,6476	0,764	0,81255	0,838
4,45	0,548	0,682	0,7417	0,7764
8,55	0,3844	0,5255	0,5976	0,6408
13,475	0,2828	0,411	0,4843	0,5304

Tabla 27: Conversión a la salida del biorreactor para cada caudal y cada concentración de lactosa, simulado con el software Berekeley-Madonna.

## Discusión de resultados

Tras los experimentos llevados a cabo en este estudio, se pueden sacar varias conclusiones con respecto a la  $\beta$ -galactosidasa y la hidrólisis de suero lácteo por parte de la misma.

En primer lugar, se han determinado las condiciones óptimas de trabajo. El rango de pH en el que la enzima trabaja a una buena actividad se sitúa entre 3 y 6, siendo el pH óptimo de 4 [Figura 1], ya que a partir de pH 6 su actividad decrece aceleradamente, lo que indica que se desnaturaliza rápidamente. Los datos de pH óptimo son parecidos a los que se han obtenido en otros trabajos, de pH 5 [6] y 4,5 [7], aunque los rangos de pH son más diferentes, proponiéndose en otros estudios valores más amplios, entre 3,5 y 8 [6] y entre 4 y 9 [7].

Con respecto a la estabilidad térmica, se ha comprobado [Figura 2] como incubada a una temperatura de 40 °C, la enzima mantiene su actividad a lo largo del tiempo, alcanzando una vida media aproximada de 277 minutos [Tabla 5], mientras que a mayores temperaturas (50 y 60 °C) la enzima se desnaturaliza más rápidamente, alcanzándose una vida media mucho más escasa, de aproximadamente 34 y 8 minutos respectivamente. Por tanto, se puede afirmar que la temperatura óptima de trabajo de la

enzima es de 40 °C, lo cual se aproxima a otros trabajos que donde se fijó en 46 °C [7] y 50 °C [6].

Al llevar a cabo el experimento para determinar las constantes cinéticas con ONPG como sustrato se observa cómo, lógicamente, la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa aumenta conforme lo hace la concentración de sustrato y disminuye en presencia de galactosa [figura 4], un inhibidor que además es producto de la hidrólisis. Observando las constantes cinéticas [tabla 8], se ve que la  $V_{max}$  es parecida para los casos en ausencia y presencia de inhibidor, mientras que la  $K_m$  aumenta considerablemente en presencia de galactosa. De ahí se deduce que la inhibición es competitiva, es decir, la galactosa se combina con la enzima libre compitiendo con el sustrato para unirse al centro activo, lo que concuerda con estudios anteriores más profundos [9].

Utilizando lactosa como sustrato se comprobó que la conversión en glucosa aumenta, obviamente, cuanto más tiempo dure la reacción y también se incrementa conforme baja la concentración de lactosa inicial [tabla 12]. De tal forma, se alcanzan conversiones del 96% en una hora para una concentración 20 mM y solo del 49% en una hora para una concentración de lactosa 100 mM.

A continuación se muestra la comparativa de las constantes cinéticas obtenidas con ONPG y lactosa como sustrato:

	ONPG	Lactosa
$K_m$ (mM)	2,301	1,0967
$V_{max}$ (U/mg)	8,412	0,366
$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	22,08	38,43
$K_{cat}/K_m$ ( $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ )	9,596	35,04
$K_i$ (mM)	6,572	1,247

Tabla 28: comparación de las constantes cinéticas de la  $\beta$ -galactosidasa medidas con ONPG y lactosa como sustrato.

Se observa como varían bastante los parámetros de un sustrato a otro, siendo mayores la  $K_m$  y  $V_{max}$  para el ONPG. La constante de especificidad, que indica la eficiencia de la enzima, resulta bastante superior en el caso de la lactosa. Además, la  $K_i$  del ONPG es mayor que la obtenida por la lactosa, lo que puede ser debido a que se usó una alta concentración de galactosa (30 mM). Comparando estos datos con la bibliografía, se observa como coinciden en que hay bastante diferencia de un sustrato a otro. Sin embargo, los valores son muy diferentes, siendo en los otros estudios  $K_m=0,77\text{mM}$  y

$V_{max}=55,6U/mg$  para ONPG y  $K_m=50mM$  y  $V_{max}=2,4U/mg$  para lactosa [6] y  $K_m=0,72mM$  para ONPG y  $K_m=18mM$  para lactosa [7].

Las grandes diferencias entre los datos de la bibliografía y los obtenidos en estos experimentos pueden haber sido debidos a errores experimentales de precisión en las medidas.

En cuanto a la inmovilización de la enzima en amberlita IRC-50, el porcentaje inmovilizado (86 %) fue bastante aceptable. Las constantes cinéticas calculadas de la  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada [tabla 25] son bastante distintas a las obtenidas en los otros dos experimentos. La  $V_{max}=9,93 U/mg$  sí se mantuvo bastante constante con respecto a la calculada con ONPG, sin embargo, se obtuvo una  $K_m=18,8mM$ , más similar al dato de la biografía [7] que al calculado en este mismo estudio. Además, la  $K_i$  resultó de  $20,49mM$ , bastante más alta que anteriormente, y la constante de eficiencia  $K_{cat}/K_m$  fue de  $55,46 mM^{-1}min^{-1}$ , mucho más alta que las calculadas para la enzima libre, lo que carece de sentido, ya que al inmovilizarse la enzima conserva su actividad cinética o la disminuye ligeramente, pero en ningún caso suele aumentar.

Por otro lado, ya al utilizar la enzima inmovilizada en el biorreactor, se observa [tablas 23, 27] como la conversión aumenta cuando la concentración del suero lactosado es menor (tal como resultó en el experimento con lactosa) y cuando el caudal es más pequeño, ya que el tiempo de residencia es mayor. Cabe destacar la gran diferencia entre los datos de conversión calculados a partir de los datos experimentales [tabla 23], que varían entre el 32% con un caudal de  $13,3 ml/min$  y concentración  $50mM$  y el 99% con un caudal de  $2,9 ml/min$  y una concentración  $5mM$ ; y los obtenidos a partir de la simulación con el software Berekely-Madonna [tabla 27], que varían entre un 28% con un caudal de  $13,475 ml/min$  y una concentración  $50mM$  y un 83,8% para un caudal de  $2,795 ml/min$  y una concentración de  $5mM$ . Si comparamos los datos de conversión hallados experimentalmente para la enzima libre [tabla 12] e inmovilizada [tabla 23], observamos que la conversión es muy parecida en los dos casos, un poco más alta incluso para el caso de la inmovilización. Sin embargo, los valores aportados por el software [tabla 27] tienen probablemente más validez.

Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que la  $\beta$ -galactosidasa proveniente del hongo *Aspergillus Oryzae* es una opción bastante adecuada para realizar la hidrólisis de lactosa, siempre que se use en las condiciones de pH y temperatura

adecuadas ya comentadas. Además, la inmovilización es un aspecto muy positivo debido a las ventajas que proporciona [8], mientras que su actividad no se ve prácticamente afectada. Sin embargo, aún queda trabajo por hacer para que esta operación sea más eficiente. Una opción podría ser la de utilizar otra sustancia donde inmovilizar la enzima, como el vidrio poroso [10], lo que ya se ha estudiado anteriormente consiguiendo conversiones de más del 95%. Por último, el caudal de suero lácteo en el reactor debería optimizarse para conseguir una conversión deseable sin aumentar demasiado el tiempo de residencia

## **Bibliografía**

- [1] Franchi O. (2010). *Suero de leche, propiedades y usos. Innovación en la industria láctea.*
- [2] <http://www.uaa.mx/investigacion/revista/archivo/revista1/Articulo%204.pdf>
- [3] [http://www.lactodata.com/lactodata/docs/lib/jose\\_luis\\_carrillo\\_tratamiento\\_reutilizacion\\_2002.pdf](http://www.lactodata.com/lactodata/docs/lib/jose_luis_carrillo_tratamiento_reutilizacion_2002.pdf)
- [4] Swagerty DL, Walling AD, Klein RM (2002). *American family physician*
- [5] Cheng A, Espinoza J, Brunser O, *Preparación y utilización de leche con bajo nivel de lactosa.*
- [6] Park YK, De Santi MSS, Pastore M.(2006). *Produccion and characterization of  $\beta$ -galactosidase from Aspergillus Oryzae.*
- [7] Tanaka Y, Kagamiishi A, Kiuchi A, Horiuchi T. (1974): *Purification and properties of  $\beta$ -galactosidase from Aspergillus Oryzae.*
- [8] [http://pendientedemigracion.ucm.es/info/btg/personales/jmsanchez/00\\_INMOVILIZACION\\_Introduccion.pdf](http://pendientedemigracion.ucm.es/info/btg/personales/jmsanchez/00_INMOVILIZACION_Introduccion.pdf)
- [9] Portaccio M, Stellato S, Rossi S, Benciveng U, Mohy Eldin MS, Gaeta FS, Mita DG. (1998). *Galactose competitive inhibition of  $\beta$ -galactosidase (Aspergillus Oryzae) immobilized on chitosan and nylon supports.*
- [10] García Garibay, Quintero Ramírez, López Munguía.(1993). *Biotecnología alimentaria*