

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**INMOVILIZACION DE LACTASA SOBRE HUESO DE POLLO GRANULAR Y  
EVALUACION DE SU POSIBLE UTILIDAD.**



**"QUIMICO"**

**GUATEMALA, ABRIL DE 1998**

06  
T.C. (1951)  
C-41

JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

- |                   |                                    |
|-------------------|------------------------------------|
| <b>DECANO</b>     | LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR    |
| <b>SECRETARIO</b> | LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA   |
| <b>VOCAL I</b>    | LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ   |
| <b>VOCAL II</b>   | LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN |
| <b>VOCAL III</b>  | LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE      |
| <b>VOCAL IV</b>   | BR. HERBERTH RAUL AREVALO ALVARADO |
| <b>VOCAL V</b>    | BR. MANOLA ANLEU FORTUNY           |

## DEDICATORIA

ACTO QUE DEDICO

A DIOS Y MI PAIS GUATEMALA

A MI MADRE

SARA CASTILLO CANCINOS

A MIS HERMANOS

LESLI DE JUAREZ, JESSICA VELASQUEZ, EDDY VELASQUEZ

A MIS AMIGOS

RAMIRO MOLINA, PABLO OLIVA, JORGE LUIS GIRON, OMAR MOLINA, JOSE  
LUIS CARLOS SANCHEZ, JORGE LUIS GRAMAJO, EDNA RAMOS, CORINA  
LINARES.

A MIS CATEDRATICOS

ESPECIALMENTE A: Msc. ADOLFO LEON GROSS, LIC. JEANETTE WYLER,  
LIC. ROSE MARIE DE GONZALEZ, LIC. SILVIA COTO DE OROZCO, LIC.  
CARLOS KLEE, Msc. LUIS SANTA CRUZ, LIC. MIGUEL HERRERA.

## **AGRADECIMIENTOS**

**EN PARTICULAR AL DOCTOR RUBEN VELASQUEZ MIRANDA POR SUS ENSEÑANZAS, TIEMPO Y PACIENCIA PARA PODER REALIZAR LA PRESENTE INVESTIGACION.**

**AL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DE LA ESCUELA DE QUIMICA BIOLÓGICA Y AL DEPARTAMENTO DE FISICOQUIMICA DE LA ESCUELA DE QUIMICA, USAC. POR SU COLABORACION AL PROPORCIONAR LOS REACTIVOS, EQUIPOS Y LABORATORIOS NECESARIOS, SIN LOS CUALES EL PRESENTE TRABAJO NO HUBIERA SIDO POSIBLE REALIZAR.**

**AL Msc. ADOLFO LEON GROSS POR SUS OPORTUNOS CONSEJOS Y RECOMENDACIONES.**

**AL LIC. CARLOS KLEE POR SU COLABORACION DURANTE LA PRESENTE INVESTIGACION.**

**AL Sr. CARLOS PEREZ Y AL Sr. GERMAN LOPEZ POR SU COLABORACION DURANTE TODA LA PRESENTE INVESTIGACION.**

**ÍNDICE**

	pag.
<b>1. RESUMEN</b>	<b>3</b>
<hr/>	
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<hr/>	
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
<hr/>	
<b>4. JUSTIFICACIONES</b>	<b>18</b>
<hr/>	
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<hr/>	
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>20</b>
<hr/>	
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
<hr/>	
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>29</b>

	Pag.
9. DISCUSIÓN	33
10. CONCLUSIONES	38
11. RECOMENDACIONES	39
12. REFERENCIAS	40
13. ANEXOS	43

## 1. RESUMEN

Se pretendió inmovilizar por adsorción lactasa grado alimenticio sobre hueso de pollo granular (HPG) de mesh 10-20. Se utilizó 1 gramo de HPG, se incubó por 30 minutos en 20 ml de una solución con una concentración de 10 mg/ml de lactasa grado alimenticio a temperatura ambiente y agitación orbital moderada.

Se llevaron a cabo experimentos de inmovilización a distintos grados de pHs: 4.5 con buffer de acetatos, 7.0 con buffer de fosfatos, 8.5 TRIS (N-tris(hidroximetil)aminometano); en los cuales no se evidenció inmovilización de lactasa grado alimenticio en HPG. Para comprobar si el procedimiento empleado funcionaba con otras proteínas, como se había reportado anteriormente, se realizaron pruebas de inmovilización con papaína y albúmina. Estas pruebas demostraron que el método funcionaba satisfactoriamente como se había reportado en la bibliografía.

Se concluyó que el HPG no es un sustrato adecuado para inmovilizar lactasa grado alimenticio, en un rango de pH de 4.5 a 8.5. La lactasa grado alimenticio contiene sustancias que posiblemente produzcan falsos positivos con el método de cuantificación de proteínas de Folin-Lowry o posiblemente libere la proteína estructural del HPG. El tipo de buffer y el periodo de agitación no son causas por las que el HPG libere proteína estructural a un pH ligeramente ácido o neutro, pero cuando se utiliza buffer de N-tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y pH 8.5, ocurre posiblemente liberación de proteína estructural del HPG ó alguna sustancia que produzca falsos positivos con el método de cuantificación de proteínas de Folin-Lowry.

Adicionalmente es importante señalar que durante la investigación, se desarrolló la metodología para medir la actividad de lactasa soluble en leche entera, que también puede aplicarse para medir la actividad de lactasa inmovilizada en leche entera.

## 2. INTRODUCCIÓN

La lactasa o B-galactosidasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de lactosa que es un disacárido hacia glucosa y galactosa, la lactosa es un azúcar que está presente en la leche. Cuando algunas personas alcanzan la edad adulta, pierden la capacidad de digerir y absorber la lactosa debido a la ausencia de lactasa.

Por esta razón es necesario que la lactosa no esté presente en la leche, para lograr esto es necesario agregar lactasa a la leche. Pero este proceso no es rentable económicamente, porque aislar la enzima es muy difícil, por tanto un método alternativo es inmovilizar la enzima, para formar un material biocatalítico que permita deslactosar la leche y evitar la pérdida de la lactasa.

Para inmovilizar la enzima, se utilizó hueso de pollo que es un sustrato altamente poroso y con una alta superficie que debió haber permitido fijar gran cantidad de lactasa. En el presente trabajo, se pretendió establecer si se lograba inmovilizar la enzima utilizando como soporte hueso de pollo. Esto se hizo agitando en un reactor, a temperatura constante.

Los resultados del estudio permitieron conocer que no era posible aplicar el material biocatalítico preparado para deslactosar leche con fines industriales, debido a que no se pudo establecer la cantidad de proteína que se inmovilizaba en el hueso de pollo granular.



### 3. ANTECEDENTES

Los procesos de inmovilización de enzimas se remontan a principios del presente siglo, desde entonces se han hecho muchos esfuerzos con el objeto de hacer más eficientes dichos procesos. A continuación se describen algunos de los experimentos sobre inmovilización de enzimas con énfasis en B-galactosidasa (12.1).

En 1968 Kay y colaboradores inmovilizaron por primera vez B-Galactosidasa sobre papel filtro impregnado con dicloro-s-triazinil celulosa y DEAE-Celulosa (12.2).

Después en 1969, Sharp y colaboradores realizaron estudios cinéticos de B-galactosidasa inmovilizada en películas de DEAE-Celulosa (12.3). Posteriormente en 1971, Robinson y colaboradores inmovilizaron B-galactosidasa con glutaraldehído en vidrio de aminoalquilsilil (12.4).

Luego en 1972 Woychik y Wondolowski inmovilizaron B-galactosidasa, obtenida a partir de *Aspergillus niger*, sobre vidrio poroso, el mismo año los autores antes mencionados inmovilizaron B-galactosidasa utilizando vidrio poroso y glutaraldehído. Este estudio determinó que la actividad retenida por la enzima inmovilizada con respecto a la enzima libre fue de un 75 % (12.5, 12.6).

En 1973, Woychik y Wondolowski usaron B-galactosidasa inmovilizada en vidrio poroso, para realizar hidrólisis de lactosa en leche y productos lácteos. Este estudio determina que la B-galactosidasa inmovilizada tiene distintos grados de actividad dependiendo del pH y que puede sufrir inhibiciones por los distintos constituyentes de la leche (12.7).

También en 1973, Olson y Stanley lograron inmovilizar B-galactosidasa en una resina de fenol-formaldehído utilizando glutaraldehído. El experimento demostró que la B-galactosidasa inmovilizada de esta manera tiene una actividad de 200 micromoles de glucosa producidos/minuto por cada gramo de material biocatalítico a un pH de 4.0 y 45 grados centígrados de temperatura (12.8).

En 1974, Hinsberg y colaboradores inmovilizaron B-galactosidasa en un gel de 2-hidroxietil-metacrilato (12.9).

En 1974, Snam y Progetti inmovilizaron B-galactosidasa por inclusión en poli acetato de celulosa. Luego en 1979 la compañía Corning Glass Co. desarrolló una técnica para inmovilizar covalentemente B-galactosidasa en vidrio poroso (12.10).

En 1976 Pastore y Morisi desarrollaron una planta piloto con el objeto de reducir la lactosa de la leche, utilizando B-galactosidasa inmovilizada por entrecruzamiento de fibras orgánicas. La planta piloto llegó a tener una capacidad de operación mínima de 8000 litros de leche/día (12.9).

Posteriormente en 1983 se desarrolló un proceso para inmovilizar B-galactosidasa con fines comerciales, la inmovilización se llevó a cabo sobre partículas de silicato (vidrio). El objeto fue la obtención de subproductos del queso cottage y del suero de la leche; y se debió al esfuerzo de la Nutrisearch Co., Koger Co. y la Corning Glass Co. (12.11).

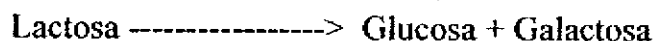
En 1986 Daniels J. describe un sistema de uso comercial para deslactosar la leche de vaca, en el que se inmoviliza la B-galactosidasa sobre carbón huesos (12.12).

### 3.1. LACTASA:

Lactasa o B-Galactosidasa (EC 3.2.1.23; CA 9001-22-3)

#### 3.1.1 Características Moleculares

La lactasa es una enzima que cataliza, la siguiente reacción:



**Características Generales:** La lactasa tiene un peso molecular entre 130000 y 500000 unidades de masa atómica, existen varios factores que afectan la actividad de la lactasa entre ellos el pH, la temperatura y la fuente de procedencia. El pH de operación de la enzima oscila entre 4 a 8.5; fuera de este rango la enzima no es estable. El rango de temperatura de funcionamiento de la enzima oscila entre los 40 y 60 grados centígrados. Se puede decir que dependiendo de la fuente dependerán mucho sus características, ya que como se puede observar en la tabla de la siguiente pagina, la lactasa de micobacterias es mejor que la proveniente de levaduras, porque muestra rangos de operación más amplios (12.13).

Tabla 3.1:

Características de los diferentes tipos de lactasa basado en su origen.

CARACTERÍSTICA	Lactasa de levaduras.	Lactasa de <i>Aspergillus</i>
Origen	<i>K. fragilis</i>	<i>A. orizae</i>
Actividad	5000 EU/g; pH 6.2/30 grados centígrados	8600 EU/g; pH 4.5/30 grados centígrados
pH optimo	6.0-6.2	4.0-5.0
Rango de estabilidad de Ph	5.5-8.5	4.0-8.5
Temperatura optima	43 grados centígrados	50-60 grados centígrados
Temperatura a la cual es estable	43 grados centígrados	60 grados centígrados
Punto Isoeléctrico	pH 4.0/6.2	pH 3.5/4.4
Pesos Molecular	130000	130000
Km	20 Mm	60 mM
DL 50 Or. rat.	>20 g/Kg	>20g/Kg

EU = 1/60 de  $\mu$ catal. un catal = 1 mol/segundo.

### 3.1.2 Fuente:

Numerosos microorganismos producen lactasa con diferentes características, la lactasa que es producida por *E. coli* fue objeto de muchos trabajos relacionados con las investigaciones sobre genética; para fines de diagnóstico, se producen lactasa a partir de *E. coli* en cantidades técnicas. Para su utilización en el área de alimentos se obtiene la lactasa a partir de levaduras y de especies de *Aspergillus*, la lactasa obtenida a partir de *K. Lactis*, de *K. fragilis* y de *Aspergillus orzae*, tienen un amplio campo de aplicación, también se produce lactasa a partir de *Aspergillus niger*, *E. coli*, *B. circulans* y *B. Stearothermophilus* (12.13).

### 3.1.3 Características Cinéticas:

El  $K_m$  (constante de Michaelis) depende del origen de la lactasa, generalmente existe una dependencia de la actividad con respecto del pH y la temperatura, dependiendo de su origen puede sufrir inhibiciones por ejemplo: la lactasa producida a partir de levaduras, es inhibida por pH básico, por temperaturas superiores a los 40 grados centígrados, por la presencia de ion  $Ca^{2+}$ , y es activada por la presencia de  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $K^+$ . Las micolactasas son mucho más estables que las provenientes de levaduras, pero sufre inhibiciones por el producto debido a la producción de la galactosa que se forma durante la hidrólisis. Lo mismo sucede con la lactasa proveniente de *B. circulans* (12.13).

### 3.1.4 Usos:

Básicamente su uso más importante es deslactosar la leche, para que las personas deficientes en lactasa puedan consumir productos lácteos, pero su uso no se limita a solo la función anteriormente mencionada, la enzima es también capaz de catalizar la hidrólisis de restos de B-D-Galactosa terminales no reducidos en B-D-galactosidos (12.13).

### 3.1.5 Análisis de Lactasa:

La actividad de enzimas se mide por dos métodos, el primero se basa en el desaparecimiento del sustrato y el segundo por medición de la aparición del producto, en el caso presentado abajo, el sustrato no absorbe luz y por lo tanto es necesario usar un sustrato artificial para cuantificar por otros medios los productos liberados. A continuación se muestran procedimientos para llevar a cabo el análisis de lactasa (12.13).

1- Método de determinación con o-nitrofenil-galactopiranosido (ONPG). En la determinación según Morisis et al. se mide la liberación de o-nitrofenol fotométricamente a 420 nm, la reacción ocurre con la enzima proveniente de *A. oryzae* a pH 4.5, con lactasa de levadura a pH 6.5 a 30 grados centígrados (12.13).

2- Determinación de lactosa como sustrato. La forma de determinación en este caso, se toma la glucosa producida durante la hidrólisis, la cual se determina, ya sea con un test enzimático de glucosa por ejemplo BM, MK o de manera rápida con biosensor enzimático, las condiciones son de lactosa al 5 %, a 30 grados centígrados a pH 4.5 ó 6.5, según el tipo de enzima empleada (12.13).

### 3.2 INMOVILIZACIÓN:

Una enzima inmovilizada, es una enzima que ha sido fijada o enlazada a un soporte sólido insoluble en agua, el tipo de enlace puede ser iónico ó covalente (12.14).

Las enzimas inmovilizadas tienen un uso práctico, puesto que pueden ser adicionados o retirados de la mezcla de reacción sin mayor dificultad, lo que se traduce en un mejor control de la reacción y permite la reutilización más de una vez de la enzima inmovilizada. Por lo anterior se puede emplear en reactores y en columnas empacadas para procesos industriales de importancia comercial (12.14).

#### 3.2.1 Soportes para la inmovilización de lactasa:

Los materiales empleados para inmovilizar lactasa dependen básicamente del tipo de enlace que se quiera formar con la enzima y del método que sea empleado, por ejemplo si se desea inmovilizar lactasa por adsorción física se debe de emplear como sustratos: Amicon HP-10, algodón hidrofóbico, fenilacetato, Romicon XM-50, carbón de huesos, ácido silil-undecanoico, tanin-aminohexyl celulosa, óxido de titanio-acero (12.14).

Para encapsular la lactasa generalmente debe de utilizarse: nylon y colidón (12.14).

En los casos en los que se use el método de entrecruzamiento para inmovilizar lactasa se utilizara: celulosa-triacetato, nitrato de celulosa, poliacrilamida, poliacrilamida-sefaran cL 4B, ácido poliacrílico, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona (12.14).

La lactasa se puede inmovilizar por medio de enlaces iónicos, generalmente se usan como soportes los siguientes: DEAE-celulosa, Duolite s-761 resina intercambiadora de iones, poligacturonato. La lactasa puede inmovilizarse incluso por interacciones hidrofóbicas, para estos casos se recomienda emplear: algodón hidrofóbico, ácido silil-undecanoico, tanin-aminohexilcelulosa y oxido de titanio acero (12.14).

### 3.2.2 Métodos de inmovilización de enzimas:

Los Procedimientos para inmovilizar enzimas se pueden dividir en:

1- Procesos que requieren de una reacción química ente la enzima y el material de soporte para formar una unión covalente, y por tanto una unión permanente se formará (12.14).

2- Procesos que atrapan o encierran a la enzima sin que se produzca una reacción química (12.14).

Dentro de la clasificación antes mencionada existen varios métodos según sea el caso, a continuación se mencionara los métodos más importantes:

**Adsorción:**

Es el método más antiguo y probablemente el menos entendido, se basa en que algunas enzimas pueden ser adsorbidas por polímeros orgánicos, vidrio, sales minerales, óxidos metálicos y compuestos porosos o derivados de sílice. Este es el método objeto de estudio, porque la lactasa se fija por adsorción al hueso de pollo granular (12.14, 12.15).

**Atrapamiento:**

Se ha logrado atrapar enzimas en varios polímeros de origen sintético y natural, entre ellos la poliacríamida es el más empleado (12.16).

**Microencapsulación:**

Se han encapsulado enzimas en membranas y varios polímeros. Estas cápsulas pueden prepararse en tamaños que varían de una a muchas micras. La membrana evita que la enzima se pierda y a su vez permite que pequeñas cantidades de sustrato alcancen la enzima (12.14, 12.15).

**Intercambio iónico:**

Por interacciones electrostáticas se pueden adherir a resinas intercambiadoras. Este método es sencillo y barato, generalmente se usan columnas con resinas empacadas (12.14, 12.15).

**Entrecruzamiento:**

Se han polimerizado enzimas por entrecruzamiento con agentes bifuncionales tales como benzídina, di-isotiocianatos, glutaraldehído, etc. En general el producto es gelatinoso y no se puede manejar con facilidad (12.14, 12.15).



#### Adsorción y Entrecruzamiento:

Con este método la enzima se inmoviliza por medio de una red polimérica entre la enzima y una matriz insoluble que generalmente es un polímero. Se pueden emplear polímeros derivados de la acrilamida, combinados con agentes polimerizantes y precursores de formación de redes poliméricas como la bisacrilamida. El objeto de esto es lograr una red polimérica donde quedara atrapada la enzima, la enzima es primeramente absorbida en las etapas iniciales de la formación de la red y finalmente es atrapada dentro de la red por un entrecruzamiento entre las distintas cadenas poliméricas. El método de inmovilización aumenta en muchos casos la estabilidad de las enzimas, se logra así una mayor estabilidad que cuando se utiliza únicamente un sólo método (12.14).

#### Copolimerización:

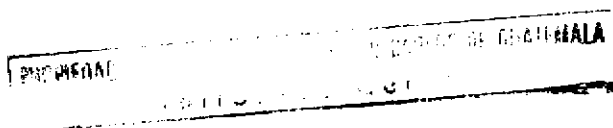
Con este método se ha inmovilizado las enzimas como parte de un copolímero, a menudo se usa la copolimerización entre anhídrido maleico y etileno, el cual se ha hecho reaccionar previamente con etilendiamina (12.17-12.20).

#### Unión Covalente:

La unión covalente de una enzima a un soporte es, en teoría el método más estable de inmovilización y se realiza por formación de enlaces covalente entre la enzima y el soporte (12.18, 12.19)

La unión covalente de una enzima y de un soporte se hace a través de cualquiera de los siguientes grupos funcionales encontrados en las enzimas:

- a) Grupo  $\alpha$ - y  $\epsilon$ - amino.
- b) Grupos  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - carboxilos.
- c) Grupos  $-SH$  y  $-OH$  de la cisteína y la serina, respectivamente.
- d) Grupo imidazol de la histidina.
- e) Anillo fenólico de la tirosina.



Y su reacción se lleva a cabo con los grupos funcionales específicos naturales o activados de los soportes (12.14).

### **3.3 Características de la enzimas inmovilizadas**

#### **Perfiles de pH:**

Se refiere a el pH óptimo, al que trabaja la enzima. Al ser esta inmovilizada esta cambia su entorno y por lo tanto su pH óptimo debidos a acumulaciones de cargas positivas y negativas, por lo tanto cambia su perfil de pH en referencia al de la enzima libre (12.14, 12.15).

#### **Cinética:**

Se refiere a como se puede ver afectada la cinética de la enzima inmovilizada frente a una libre, trata de encontrar una relación entre los efectos electrostáticos causados por el soporte, carga del sustrato, diámetro de poro del sustrato, agitación, velocidad de flujo etc. (12.14, 12.15).

#### **Estabilidad Térmica:**

Las enzimas son susceptibles a una degradación térmica, por lo tanto, si aumentamos la temperatura hasta un cierto punto; las enzimas empezaran a degradarse o inactivarse, si embargo, en muchos casos las enzimas inmovilizadas presentan un aumento en la estabilidad térmica por lo que se le pueden aplicar temperaturas más altas. (12.14, 12.15).

#### **Estabilidad de Operación:**

Se puede determinar la estabilidad de una enzima de manera estática o dinámica. En la práctica es muy importante determinar durante cuánto tiempo puede dar una enzima resultados adecuados. (12.14, 12.15).

### Método de Adsorción:

Es la técnica más antigua para inmovilización de enzimas en lo que respecta a los métodos no covalentes. Se basa en una adsorción física o enlace iónico o ambos de la enzima a la superficie del material usado como soporte (12.17).

Se prefiere que el soporte tenga una gran área superficial y que su relación grupo hidrofílico vrs. grupo hidrofóbico sea alta para que una gran cantidad de enzima pueda ser inmovilizada ya sea por adsorción física o por enlace iónico. El hueso de pollo cumple con estas características y a que es un material poroso y por tanto tiene un gran área superficial. Otra ventaja del método de adsorción es que la enzima sufre muy pocos cambios conformacionales con lo que la pérdida de actividad con respecto a la enzima libre es muy poca. Es importante señalar que a menudo se necesita de un proceso de entrecruzamiento posterior a la adsorción debido a la debilidad de las fuerzas que intervienen de la adsorción de la enzima (12.17).

En el caso de la adsorción física, las fuerzas que intervienen en la inmovilización de la enzima incluyen puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. La inmovilización vía enlaces iónicos incluyen puentes salinos entre los grupos cargados de las enzimas y sus respectivas cargas opuestas en el soporte.

Debido a la naturaleza de las fuerzas envueltas en los métodos de inmovilización no covalentes se da fácilmente un proceso inverso llamado desorción, el cual no es más que la liberación de la enzima inmovilizada (12.17).

Por tanto para evitar los procesos de desorción en los medios de reacción y la respectiva pérdida de la enzima es necesario tener un estricto control de las condiciones de reacción tales como pH, fuerza iónica, temperatura, agitación, etc (2.17).

A pesar de los inconvenientes presentados anteriormente la inmovilización de enzimas por adsorción es un proceso muy barato si se compara con los métodos covalentes y usando hueso de pollo granular el precio baja aún más, porque es una materia prima de origen natural abundante y de bajo costo (12.17).

Es importante señalar que los métodos de adsorción son menos específicos que los métodos covalentes, y en los casos que se ven involucrados sitios activos en la inmovilización por adsorción viene acompañado de una baja en la actividad del material biocatalítico, además las condiciones de los métodos de adsorción son mucho más suaves que las de los métodos covalentes por tanto una menor cantidad de enzima es degradada durante el proceso de inmovilización de la enzima (12.17). Otro factor que es importante tomar muy en cuenta es la cantidad de enzima, esto se refiere a que si se sobrecarga el hueso de pollo granular con lactasa, dará como resultado una pérdida de la actividad de la lactasa por el impedimento estérico que causa el sobrecargar el sustrato con la enzima (12.17).

3.3.1 Para lograr una buena adsorción de la enzima en el proceso de inmovilización se deben de tener en cuenta los siguientes aspectos:

**- El pH:**

El pH es un factor muy importante porque de no controlarse puede llevar a la desnaturalización o inactivación del material catalítico ya sea porque la enzima no se fije o por que la enzima sufra cambios en su estructura que no le permitan reaccionar con la lactosa (12.17).

**- Cofactores:**

En ocasiones es necesario agregar iones metálicos para lograr activar la enzima; en el caso particular de el material biocatalítico se recomienda usar soluciones que contengan iones  $K^+$  (12.17).

**- Diámetro del poro:**

El hueso de pollo granular debe de tener un diámetro de poro uniforme y suficientemente grande, para que la enzima muestre actividad, generalmente se prefiere que el diámetro de poro sea por lo menos cuatro veces el diámetro de la proteína, puesto que si el poro es muy pequeño la enzima no podrá entrar en él y por tanto no podrá inmovilizarse la lactasa (12.17).

Existen varias técnicas para inmovilizar enzimas por el método de adsorción:

- 1- Procedimiento estático.
- 2- Procedimiento por electrodeposición.
- 3- Procedimiento en Columna.
- 4- Procedimiento por mezclado e inmovilización en reactor.

La técnica que se aplicara en el presente estudio, será la cuarta, porque da una inmovilización uniforme y además es la más adecuada para su implementación, y por ser una técnica sencilla y barata (12.17).

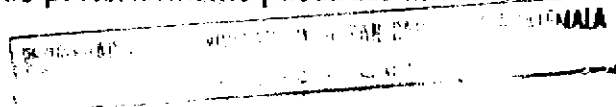
#### 4. JUSTIFICACIONES

Debido a que una buena parte de la población adulta presenta intolerancia a la lactosa, la intolerancia a la lactosa se puede evitar al no consumir leche o productos derivados de ésta o bien consumiendo leche o sus productos deslactosados.

El deslactosado de la leche puede realizarse de manera económica utilizando lactasa, la que puede ser en forma soluble o bien lactasa inmovilizada. Existe una serie de materiales sobre los cuales, la lactasa puede ser inmovilizada. El hueso de pollo puede ser uno de estos; la lactasa podría inmovilizarse por adsorción sobre hueso de pollo.

El método de inmovilización de lactasa se prefiere sobre la utilización de la lactasa soluble debido a su bajo costo. La inmovilización de lactasa sobre hueso de pollo es adecuada porque este es una materia prima de origen de natural y por ello no debe de alterar las propiedades de la enzima. También puede ser ventajosa debido a que no es necesario llevar a cabo reacciones químicas, que degradarían o modificarían de alguna manera la estructura molecular de la lactasa. Esto se traduce en una menor posibilidad de pérdida de actividad enzimática.

El hueso de pollo como soporte es un material barato. Adicionalmente la inmovilización puede realizarse por procedimientos rápidos, sencillos y económicos. La aplicabilidad del material biocatalítico (enzima y hueso de pollo), radica en que es un producto natural y puede ser utilizado sin mayor problema en procesos de la industria de alimentos. En base a lo anterior resulta justificable el estudio del hueso de pollo granular, como material de soporte para la inmovilización de lactasa con el fin de obtener un material biocatalítico; que posteriormente pueda ser útil en el deslactosado de la leche.



## 5. OBJETIVOS

### Generales:

- 1o. Determinar el grado de inmovilización de lactasa sobre hueso de pollo granular, con el fin de evaluar su utilización en el deslactosado de la leche.

### Específicos:

- 2o. Determinar los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) de lactasa inmovilizada usando como sustrato lactosa.
- 3o. Determinar la eficiencia de la inmovilización (mg de proteína fijada/g de hueso de pollo granular) de lactasa sobre hueso de pollo granular (HPG).
- 4o. Determinar la eficacia (mmoles hidrolizados de lactosa/seg. por g de lactasa-HPG con respecto a los mmoles hidrolizados de lactosa/seg. por g de lactasa libre) de la enzima inmovilizada.
- 5o. Determinar cual es la actividad catalítica Retenida del material biocatalítico (Actividad en mmoles por seg. de un segundo ensayo consecutivo de lactasa-HPG con respecto a la actividad exhibida en mmoles por seg. de un primer ensayo de lactasa-HPG) de la lactasa inmovilizada sobre hueso de pollo.
- 6o. Evaluar la aplicabilidad (se refiere al porcentaje de lactosa hidrolizada en un cierto periodo de tiempo; utilizando leche entera como solución problema) de la lactasa inmovilizada en hueso de pollo granular para deslactosar leche entera.

## **6. HIPÓTESIS**

Utilizando hueso de pollo granular como soporte se puede inmovilizar lactasa. La lactasa inmovilizada sobre hueso de pollo granular mantendrá una buena parte de la actividad de la enzima nativa (soluble), en el material biocatalítico resultante.



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS:

### 7.1 Universo :

El universo de la investigación está constituido por la lactasa inmovilizada en hueso de pollo granular (lactasa-IIPG).

### 7.2 Materiales:

#### Materia Prima:

-Hueso de pollo granular.

#### Equipo:

-Molino Willey Mill Modelo No.3

-Espectrofotómetro Milton Roy, Spectronic 21D.

-Reloj con Alarma.

-Potenciómetro Corning.

-Tamiz No. 8.

-Tamiz No. 20.

- Estufa con agitación magnética.

### 7.3 Reactivos:

Todos los reactivos que a continuación se presenta son grado analítico.

-Acetato de sodio.

-Ácido acético.

-HCl.

-Lactosa. Para fines bioquímicos.

-Lactasa. Para grado alimenticio.

-Glucosa. Para fines bioquímicos.

-Papaína. Para fines bioquímicos.

-Albúmina. Para fines bioquímicos.

- $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .
- NaOH.
- Tartrato de potasio y sodio.
- $\text{CuSO}_4$ .
- Tungstato de sodio.
- Molibdato de sodio.
- Bromo.
- $\text{H}_3\text{PO}_4$ .
- $\text{Li}_2\text{SO}_4$ .
- Hidróxido de bario.
- Fenolftaleína.
- Sulfato de zinc.
- N-tris(hidroximetil)aminometano (TRIS).
- KOH.
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$

#### 7.4 Cristalería:

- Tubos de ensayo.
- Pipetas Serológicas.
- Pipetas Volumétricas.
- Beakers.
- Balones Aforados.
- Agitadores de vidrio.
- Celdas de Cuarzo.
- Embudos de vidrio.

## 7.5 Métodos:

### 7.5.1 Preparación del Hueso de Pollo Granular:

La preparación del hueso de pollo granular (HPG), se lleva a cabo mediante el siguiente procedimiento:

- El hueso de pollo crudo se separa de los restos de músculo y se sumerge en una solución de KOH al 5 % (p/v) por 48 horas.
- Se procede a cortar los huesos de forma transversal y se introducen nuevamente en KOH por otras 24 horas, al finalizar este periodo, se lava con abundante agua, posteriormente se seca y se lava dos veces sucesivas con 3 volúmenes de hexano.
- Después se procede a evaporar el hexano, los huesos se fragmentan con un molino (Willey Mill Modelo No. 3) a través de un tamiz No. 8 y posteriormente en un tamiz No. 20, el material obtenido se tamiza diferencialmente para la separación de las partículas en base a sus distintos tamaños (12.21).

7.5.2 Inmovilización de lactasa sobre Hueso de pollo: De 1.0 a 2.0 gramos de HPG Mesh (14-20) se agregan a 20 ml de una solución de 10 mg/l de lactasa grado alimenticio (ver anexo No. 1) en buffer de acetatos 100 mmol/l de pH 4.5.

- Se agita orbitalmente a 23 grados centígrados por 30 minutos.
- Al final de este tiempo el material biocatalítico (lactasa-HPG) se filtra y lava dos veces con 10 ml de buffer de acetatos 100 mmol/l de pH 4.5, el lavado se repite otras 2 veces utilizando buffer de fosfatos de 100 mmol/l y pH 6.5.
- En caso de que no funcione la inmovilización de lactasa con HPG en buffer de acetatos 100 mmol/l pH 4.5, se ensaya la inmovilización bajo las siguientes condiciones: En buffer de fosfato 100 mmol/l pH 7.0 y en buffer de N-tris(hidroximetil)aminometano 100 mmol/l y pH 8.5 (12.21).

- Se usa como control negativo 1.0 gramo de HPG en 20 ml de solución amortiguadora. Se realizan pruebas confirmatoria del método de inmovilización sobre HPG utilizando solución de papaína 10 mg/ml, y solución de albúmina 10 mg/ml, siguiendo el procedimiento de inmovilización anteriormente descrito; utilizando buffer de acetatos 100 mmol/l, pH 4.5.

### 7.5.3 Evaluación de la eficiencia de la inmovilización de lactasa sobre hueso de Pollo:

La cantidad de proteínas totales en el filtrado y los lavados se determina por el método de Lowry. (12.22) y por diferencia se calcula la cantidad de lactasa en mg retenida por Unidad de peso seco en gramos de HPG. Como control se lleva a cabo el mismo procedimiento de inmovilización, utilizando una solución de 10 mg/ml de albúmina en lugar de lactasa (12.21). La lactasa retenida por el HPG se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Lactasa Retenida} = \frac{(\text{Conc. Filtrados}) * (\text{Vol. Filtrados}) - (\text{Conc. Inicial}) * (\text{Vol.})}{\text{Peso de Pollo Granular}}$$

Método de Folin-Lowry:

Procedimiento para la Determinación de Proteína por el Método de Folin-Lowry.

Colocar los tubos de ensayo para:

- Blanco: 0.2 ml de agua más 10 ml de reactivo cuproalcalino de trabajo.
- Soluciones Patrón y Muestras: 0.2 ml de patrón de proteína conteniendo 40 mg/dl ó 0.2 ml de muestra más 10 ml de reactivo cuproalcalino de trabajo.
- Mezclar el contenido de cada tubo y dejarlos en reposo por 15 minutos.
- Agregar rápidamente a todos los tubos 1 ml de reactivo de fenoles diluido; mezclar inmediatamente y cuidadosamente después de cada adición (esto se debe a la inestabilidad del reactivo en solución alcalina).

- Dejar en reposo un mínimo de 30 minutos (es estable durante varias horas) y leer la densidad óptica del patrón y de la muestra en un Espectrofotómetro UV-Visible, a 750 nm, frente al blanco de reactivos y luego calcular la concentración (12.22).

Para más información sobre el método ver anexo No. 2.

#### 7.5.4 Evaluación de la eficacia de la inmovilización de lactasa sobre hueso de pollo granular.

- En un beaker colocar 1.0 g de lactasa-HPG y agregar 10 ml de lactosa al 5 % p/v en buffer de fosfato de potasio 100 mmol/l, pH 6.5; agregar un agitador magnético y proceder a agitar a 36-40 °C por 25 minutos.

- Paralelamente hacer un ensayo utilizando lactasa soluble, en una concentración equivalente a la cantidad contenida en el material biocatalítico. Luego de finalizado el tiempo filtrar el material biocatalítico en papel filtro Whatman No.1.

- Después del periodo de reacción, se toma una alícuota de 1 ml del filtrado y se coloca en un tubo de ensayo en un baño de agua a 90 °C durante cinco minutos, después de lo cual se espera a que la alícuota llegue a temperatura ambiente. Este procedimiento inactiva la lactasa que pudiere haber sido liberada del material biocatalítico.

- Luego se procede a determinar la cantidad de glucosa producida en cada uno de los ensayos utilizando el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa.

Para realizar esto se prepara una curva de calibración con distintas concentraciones de glucosa (12.23). Ver anexo No 3.

- Se gráfica la curva de calibración utilizando los datos de absorbancia vs. la concentración respectiva; posteriormente se calcula las concentraciones de los tubos de los experimentos con la lactasa-HPG y lactasa libre. Los resultados de la actividad se expresan como moles de lactosa hidrolizados/segundo x g de enzima (12.23).

La eficacia del método se puede calcular empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Eficacia: } \frac{\text{Moles hidrolizados de lactosa/seg. x g de lactasa-HPG}}{\text{Moles hidrolizados de lactosa/seg. x g de lactasa libre}} \times 100 \%$$

#### 7.5.5 Actividad Catalítica Retenida del material biocatalítico:

La actividad catalítica retenida del material biocatalítico (ACRB), se puede evaluar al someter al material biocatalítico a dos o tres ensayos sucesivos de actividad enzimática. Utilizando en ambos casos el mismo material biocatalítico; se procede de la siguiente manera:

- Una vez terminado el primer ensayo, el material biocatalítico se remueve por filtración y se lava cuatro veces con buffer de fosfatos de potasio 100 mmol/l, pH 6.5, después se emplea por segunda vez en un ensayo de actividad catalítica, utilizando un sustrato fresco.
- Posteriormente se calcula la actividad del material biocatalítico en ambos ensayos, la estabilidad se expresa como porcentaje de la actividad exhibida en el primer ensayo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ACRB: } \frac{\text{Actividad en el segundo ensayo de lactasa-HPG}}{\text{Actividad en el primer ensayo de lactasa-HPG}} \times 100 \%$$

(12.21).

#### 7.5.6 Aplicabilidad de la lactasa inmovilizada en hueso de pollo granular.

Para evaluar la aplicabilidad de la lactasa inmovilizada en hueso de pollo se llevan a cabo experimentos similares a los que se realizaran en los numerales 4 y 5 de la presente sección con las siguientes modificaciones:

- En lugar de usar una solución de lactosa al 5 % en buffer de fosfatos, se reemplaza por leche entera para la prueba.

- Antes de agregar los reactivos para determinar glucosa, se debe desproteínizar la leche según el método de filtrado libre de proteínas de Somogyi-Nelson (12.24). Ver anexo No. 4.

#### 7.5.7 Diseño de la Investigación:

##### 7.5.7.1 Numero de Replicas:

Se efectúa un estudio piloto con cinco experimentos de eficiencia de la fijación de lactasa mediante el cual se determina la varianza necesaria para calcular el número de replicas o repeticiones para llevar a cabo el estudio.

El numero de replicas se calcula mediante la siguiente formula:

$$n = (NC)^2 \sigma^2 / \Delta^2$$

Donde :

NC = Valores medios con un intervalo de confianza del 95 %.

$\sigma$  = Varianza.

$\Delta$  = Limite de error en la estimación.

De el valor de "n" dependerá si se aplica "t de Student" ó "z".

##### 7.5.7.2 Análisis de Datos:

- Para la determinación de eficiencia, eficacia estabilidad y aplicabilidad etc. Se utiliza estadística descriptiva mediante %, tablas y gráficas.

- Se efectúa una estimación de los valores medios de eficiencia eficacia etc. Con un intervalos de confianza del 95 % (IC 95 %).

Para "t de Student":

$$IC95\% = \bar{y} \pm t_{\alpha/2}(s) / \sqrt{n}$$

Si el numero de replicas es 20 experimentos.

Para "z":

$$IC95\% = \bar{y} \pm z_{\alpha/2}(\sigma) / \sqrt{n}$$

Si el numero de replicas es 10 experimentos.



## 8. RESULTADOS

Tabla No.1

Prueba de inmovilización de lactasa sobre hueso de pollo granular utilizando 1.0 gramos de hueso procesado y 200 mg de proteína, en buffer de acetatos 100 mmol/l, pH 4.5.

Muestra	mg de Proteína en solución al final del Experimento	diferencia en mg
Sin agitación	200	0
Control Negativo	0	0
Prueba 1	210	10
Prueba 2	209	9
Prueba 3	410	210
Prueba 4	202	2
Prueba 5	349	149
	Media = 276	Desviación = $\pm 83$

Tabla No. 2

Prueba de inmovilización de lactasa sobre hueso de pollo granular utilizando 1.0 gramos de hueso procesado y 205 mg de proteína, en buffer de fosfatos 100 mmol/l, pH 7.0.

Muestra	mg de Proteína en solución al final del Experimento	Diferencia en mg
Control Negativo	0	0
Prueba 1	223	18
Prueba 2	209	4
Prueba 3	210	5
Prueba 4	420	215
Prueba 5	269	64
	Media = 266	Desviación = ±63

Tabla No. 3

Prueba de inmovilización de lactasa sobre hueso de pollo granular utilizando 1.0 gramos de hueso procesado y 222 mg de proteína, en buffer de N-tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) 100 mmol/l, pH 8.5.

Muestra	mg de Proteína en solución al final del Experimento	Diferencia en mg
Control Negativo	20	20
Prueba 1	438	216
Prueba 2	345	123
Prueba 3	233	11
Prueba 4	258	36
Prueba 5	239	17
	Media = 303	Desviación = $\pm 71$

Tabla No. 4

Prueba de inmovilización de papaína, albúmina y lactasa sobre hueso de pollo granular utilizando 1.0 gramos de hueso procesado, en buffer de acetatos 100 mmol/l, pH 4.5.

Muestra	mg de proteína iniciales	mg de proteína finales
Solución papaína	251	245
Solución Albúmina	201	201
Solución Lactosa	208	239

A continuación se presenta una breve explicación acerca de algunos términos presentes en la tablas anteriores.

**Prueba #:** Se refiere a una prueba llevada a cabo con el buffer especificado con una concentración de lactasa igual a la de solución inicial de lactasa con agitación orbital durante un periodo de 30 minutos.

**Control negativo:** Se Refiere a una prueba llevada a cabo solo con el buffer especificado, sin lactasa y con agitación orbital durante un periodo de 30 minutos.

**Sin agitación:** Se refiere a una prueba con el buffer especificado con una concentración de lactasa igual a la de la solución inicial sin agitación orbital durante un periodo de 30 minutos.

## 9. DISCUSION

Como se puede observar en la tabla No.1, en un buffer de acetatos pH 4.5, la solución final después de realizado el experimento, contenía una mayor cantidad de proteína que la solución al inicio del experimento. Por tanto se puede decir que no hubo inmovilización o no se puede medir con el método de Folin-Lowry, la cantidad de proteína que posiblemente se inmovilizó, sobre el HPG. Probablemente se libero proteína o alguna sustancia que da falso positivo con el método de Folin-Lowry.

El método de Folin-Lowry se basa en la utilización del reactivo de Folin-Ciocalteu, que tiene como principio la oxidación de compuestos fenólicos en condiciones alcalinas, así el reactivo de Folin-Ciocalteu es reducido de su color inicial amarillo oro, a un color azul intenso. A una solución de proteínas se le agrega el ión cúprico en tartrato débilmente alcalino, para formar un complejo tipo Biuret entre el cobre y la proteína que luego se trata con el reactivo de fenol diluido. El complejo de Biuret y las cadenas laterales aromáticas de la proteína reducen al reactivo de Folin-Ciocalteu (12.25).

Este reactivo se usa para medir compuestos fenólicos y para determinar tirosina, el aminoácido que contiene una cadena lateral fenolica. Dado que casi todas las proteínas contienen tirosina esta reacción ha sido usada para la determinación cuantitativa de proteínas. Las proteínas varían en su contenido de tirosina, triptófano e histidina; que son aminoácidos que contienen grupos fenólicos. Así el equivalente de Folin-Ciocalteu para varias proteínas variará en proporción con su contenido de los aminoácidos que reaccionan. Los métodos de determinación basados en el reactivo de Folin-Ciocalteu no pueden recomendarse para la determinación de proteínas con soluciones que contengan mezclas de muchas proteínas (12.25).

Por tanto en la determinación de proteínas por el método de Folin-Lowry debe de emplearse en soluciones que contengan proteínas, con composición conocida de aminoácidos para así poder determinar su equivalente de Folin-Ciocalteu y obtener de esta manera resultados confiables (12.25). Es importante señalar que la enzima empleada, es de un grado alimenticio y no enzima cristalizada de alto grado de pureza, por lo tanto pudo contener ácidos aminados o mezclas de proteínas que pueden dar falsos positivos utilizando el método de cuantificación de proteínas de Folin-Lowry o liberarlos del hueso; durante el proceso de inmovilización (12.26).

Por tanto no se puede afirmar que sea proteína lo que se cuantificó con este método o que la cantidad de proteína encontrada por este método sea la cantidad real de proteína que estaba presente. Es importante señalar que esto solo ocurrió cuando había solución de lactasa grado alimenticio presente, ésto no ocurrió cuando se inmovilizó papaína sobre HPG, en donde se inmovilizó 6 mg de proteína/g de HPG, resultado que es muy similar al encontrado en experimentos anteriores (12.21). Tampoco hubo un aumento de proteína al emplear albúmina, aunque no existió inmovilización. Como se puede observar en la tabla No. 4. Al examinar los datos del control negativo se puede establecer que no hubo liberación debida a la utilización del buffer de acetatos, ni la agitación era un factor que pudiera influir en la probable liberación de proteína por parte del HPG. Entre los factores que influyen en la inmovilización de proteína sobre HPG se encuentra la carga ó estructura iónica de la proteína, debido a esto se realizaron experimentos de inmovilización a distintos pH, porque del grado de acidez o basicidad de una solución depende la estructura iónica de una proteína.

En la tabla No. 2 observan los datos obtenidos, al tratar de inmovilizar lactasa en hueso de pollo granular empleando buffer de fosfatos pH 7.0, en este tipo de buffer nuevamente, se observa que no hay indicios de inmovilización de lactasa.

Se puede observar el mismo fenómeno, de aumento de cantidad de proteína que en los experimentos llevados a cabo con buffer de acetatos pH 4.5. La prueba del control negativo revela que la agitación y el tipo de buffer empleado no es el responsable del posible aumento de la cantidad de proteína..

En la tabla No. 3 muestran los resultados obtenidos al intentar inmovilizar lactasa en hueso de pollo granular utilizando un buffer de N-tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), pH 8.5, al igual que en los experimentos anteriores no hubo inmovilización de lactasa en el hueso de pollo granular. Se puede observar un aumento en la cantidad de proteína en cada una de las pruebas llevadas a cabo, la media sigue siendo mucho mayor a la cantidad de proteína en la solución inicial. Pero además se observa que en la prueba del control negativo se libera proteína o como ya se menciono anteriormente se liberan sustancias que pudieran haber dado un falso positivo, cuando se emplea el método de Folin-Lowry. Por tanto se podría indicar que con buffer de TRIS, a pH 8.5, el HPG muestra cierto grado de degradación lo que se evidencia por la liberación de proteína o alguna sustancia que produzca un falso positivo con el método de Folin-Lowry.

De lo anteriormente expuesto se puede indicar que el hueso de pollo no es un sustrato adecuado para inmovilizar lactasa grado alimenticio. Que la agitación y el tipo de buffer, no son factores que afecten la liberación de proteína por parte del hueso de pollo granular; excepto en el caso de la utilización del buffer de TRIS. La enzima utilizada contiene sustancias, que podrían provocar la liberación de proteína por parte del hueso de pollo granular o en su defecto sustancias que luego del tiempo de agitación de un falso positivo con el método de Folin-Lowry.

Debido a los resultados anteriores no se puede continuar con las demás etapas de la experimentación, porque la hipótesis se rechaza.

Es importante señalar que durante la presente investigación se desarrolló la metodología para la medición de la actividad de lactasa soluble en leche entera. Esta metodología fue empleada exitosamente para seguir el transcurso de la reacción en un experimento en que lactasa fue agregada a leche entera. Se pudo conocer satisfactoriamente el resultado del experimento como puede observarse en el anexo No. 5. El experimento consistió en colocar 20 ml de leche entera y 6.05  $\mu\text{g/ml}$  de lactasa grado alimenticio que equivale a 0.01 nanocatalas y dejar que la reacción se lleve a cabo por 30 minutos. Como se puede observar la cinética tiene un comportamiento que se podría interpretar como el de una cinética orden cero. Pero reacciones en las que hay gran cantidad de sustrato y muy poco de catalítico como es el caso presente, también tienen el mismo comportamiento, por lo que la reacción es del tipo de velocidad constante o las denominadas de pseudo orden con respecto al sustrato.

La lactosa es el azúcar que se encuentra en leche en una concentración cercana al 5 % p/v. Cuando se coloca en leche entera una pequeña cantidad de lactasa soluble se produce una reacción en la que la lactasa rompe el enlace glucosídico entre la galactosa y la glucosa que son los monosacáridos constituyentes de la lactosa.

La glucosa producida puede ser cuantificada por el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa (ver anexo No. 3). Este método se basa en la reacción aeróbica de la glucosa con la interacción de la enzima glucosa oxidasa para producir gluconato y peróxido de hidrógeno. Este último reacciona con una sal amónica derivada de un ácido sulfónico colorante y una peroxidasa para dar un colorante cuya intensidad es proporcional a la cantidad de glucosa presente .



Debido a que la leche tiene una composición muy compleja en la que las proteínas juegan un papel muy importante es necesario que sean separadas antes de cuantificar la glucosa presente; debido a que las proteínas interferirán con la cuantificación de glucosa. Esto se logró con desproteínización según el método de Simogyi-Nelson (ver anexo No. 4) que se utiliza para desproteínizar suero sanguíneo, esto es importante porque demuestra que el método de Simogyi-Nelson se puede aplicar para obtener filtrados libres de proteína a partir de leche entera.

La metodología desarrollada puede aplicarse para evaluar la actividad de lactasa inmovilizada en leche entera. En la literatura consultada no se encontró reportes de métodos para evaluar actividad de lactasa similares al anteriormente descrito, que utiliza el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 El hueso de pollo granular no es un sustrato adecuado para inmovilizar lactasa grado alimenticio, en un rango de pH de 4.5 a 8.5.
- 10.2 La enzima lactasa grado alimenticio contiene sustancias que posiblemente produzcan falsos positivos con el método de cualificación de proteínas de Folin-Lowry ó posiblemente libere la proteína estructural del hueso de pollo granular.
- 10.3 El tipo de buffer y el periodo de agitación no son causas por las que el hueso de pollo granular libere su proteína estructural a un pH ligeramente ácido o neutro.
- 10.4 Con buffer de N-tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), 100 mmol/l y pH 8.5 ocurre una posible liberación de proteína estructural, del hueso de pollo ó de alguna sustancia que produzca falsos positivos con el método de cuantificación de proteínas de Folin-Lowry.
- 10.5 El método de Simogyi-Nelson de desproteinización en suero sanguíneo logro emplearse eficientemente para desproteinizar leche entera.

## **11. RECOMENDACIONES**

- 11.1 Se recomienda repetir los experimentos con lactasa cristalizada de alto grado de pureza, para verificar si la lactasa grado alimenticio contiene sustancias que evitan su unión al hueso de pollo granular.

## 12. REFERENCIAS

- 12.1 Maugh T. A Renewed interes immobilized enzymes. *Science*. 1984; 223:474-476.
- 12.2 Kay G. et al. Preparation an use of porous sheets with enzyme action. *Nature*. 1968; 217:641-642.
- 12.3 Sharp A. et al. The kinetics of B-Galactosidase attached to porous cellulose sheets. *Biotechnology and Bioengineering*. 1969; 11:363-380.
- 12.4 Robinson P. et al. Poruos glasss as a solid suport for immobilization or affinity chomatography of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1971; 242:659-661.
- 12.5 Woychik J. and Wodolowski M. Covalent bonding of fungal B-Galactosidase to glass. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1972; 289:347-351.
- 12.6 Woychik J. and Wondowski M. Lactose hydrolisis in milk and milk products by bound fungal B-Galactosidase. *Journal of Milk and Food Technology*. 1973; 36:31-33.
- 12.7 Olson A and Stanley W. Lactase an other enzymes bound to a phenol-formaldehyde resin with glutaraldehyde. *Juornal of Agricultural and Food Chemistry*. 1973; 21:440-445.
- 12.8 Hinsberg I. Gel entrapped enzymes: Kinetic studies of immobilized B-Galactosidase. *Biotechnology and Bioengineering*. 1974; 16:943-963.

- 12.9 Thibault P. Les Enzymes immobilisées. mise en oeuvre et applications. Industries Alimentaires et Agricoles. 1984; 101:885-889.
- 12.10 Mosbach K. **Methods in Enzymology**. First Edition. Academic Press. USA. 1976. Vol. 44 pp. 822-830.
- 12.11 Howard H. et al. Scalling up an immobilized enzyme system. Science. 1986; 232:1396-1403.
- 12.12 Daniels M. Low cost process for lactose hidrolisis with immobilized lactase. Food Technology. 1985; 39:68-70.
- 12.13 Uhlig Helmut. **Enzymes Arbeiten fur Uns**. Hanser. Germany. 1991. pp. vii+436.
- 12.14 Quintero R. **Tecnología Enzimática**. Primera Edición. Editorial Alhambra Mexicana S.A. México. 1981. pp. 195-200.
- 12.15 Gacesa O. and Hubble J. **Enzyme Technology**. First Edition. Open University. Great Britain. 1987. pp. 80-83.
- 12.16 Conlon H. and Walt D. Immobilization of enzymes in polimer supports. Journal of Chemical Education. 1986; 64:368-370.
- 12.17 Bruner G. et al. Large agarose beads for extracorporeal detoxification systems. The International Journal of Artificial Oragans. 1979; 3:164-169.
- 12.18 Klaus Mosbach et al. **Methods in Enzymology**. First Edition. Academic Press. USA. 1976. Vol. 40 pp. 148-157.

- 12.19 Kurokawa Y. et al. Immobilization of enzyme onto celulosa-titanium oxide composite fiber. *Biotechnology and Bioengineering*. 1993; 17:49-55.
- 12.20 Aguado J. et al. Immobilization of B-Galactosidase from *Penicillium funiculosum* on nylon powder. *Biotechnology Appl. Biochem.* 1993; 23:22-45.
- 12.21 Velásquez R. et al. Utilización de hueso de pollo para la inmovilización de enzimas, inmovilización de papaina. En Prensa. 1995. pp 1-9.
- 12.22 Lowry O. et al. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193:265-275.
- 12.23 Velásquez R. **Cinética Enzimática**. Determinación de los parámetros cinéticos de la lactasa. Depto. de Bioquímica, USAC. Guatemala. 1994. pp. 1-5.
- 12.24 Toro G. and Akerman P. G. **Practical Chemistry**. Little Brown and Co. USA. 1975. pp. 108-109
- 12.25 Tietz N. et al. **Química Clínica Moderna**. Primera Edición. Editorial Interamericana. México. 1972. Pp. 193-194.
- 12.26 Lynch M. et al. **Métodos de Laboratorio**. Segunda Edición. Nueva Editorial Interamericana. México. 1984. pp. 223-224.

**13. ANEXOS**

## Anexo No. 1

**MAXILACT LX 5000:**

Este producto fue producido por Quimiorgan S.A. de México; bajo licencia de Gist-Brocades nv Industrial Products Division in Delft, Holland.

**4.1 Descripción:**

Maxilact LX 5000 es una preparación de lactasa líquida altamente purificada, derivada de la levadura láctica **Kluyveromyces lactis**. Para su purificación adicional es sometida a varios procesos que eliminan las actividades secundarias que pudieran afectar la calidad de la leche de una manera adversa. Número internacional de la enzima: EC 3.2.1.23 .

**4.2 Características:****Apariencia:**

Líquido amarillo ligeramente marrón.

**Actividad:**

Un gramo de Maxilact LX 5000 contiene 5.000 Unidades Neutras de Lactasa (NLU). Una NLU es igual a 0.01667 microcatales de glucosa a partir de lactosa, un catal es igual a 1 mole/seg.

**Inhibidores:**

Metales pesados, sodio y calcio.

**Activadores:**

Potasio, magnesio y Manganeseo.

INFORMACIÓN DE LA COMISIÓN NACIONAL DE CALIDAD DE LOS ALIMENTOS

SECRETARÍA DE SALUD PÚBLICA



**Efecto de la Temperatura:**

A su pH óptimo, la temperatura óptima es de unos 35 a 40 grados centígrados.

**Efecto del pH:**

A una temperatura de 30 grados centígrados el pH óptimo se encontrará entre 6.3 y 6.7.

**Estabilidad:**

La enzima debe de ser almacenada en un lugar fresco de 0 a 5 grados centígrados.

**Aplicación:\***

Hidrólisis de lactosa en leche.

---

\* Para más información comunicarse a Quimiorgan S.A. Av. de las Torres No. 75 Naucalpan, Edo. de México, C.P. 53500.

## Anexo No. 2

## Reactivos:

## 1.1 Reactivo de Tartrato Alcalino:

Disolver 20 gr. de carbonato de sodio y 0.5 g de tartrato de sodio y de potasio en un litro de NaOH 0.1 N.

## 1.2 Reactivo Cuproalcalino de Trabajo:

Mezclar 45 ml de reactivo de tartrato alcalino y 5 ml de una solución de sulfato de cobre al 0.1 %. Prepárese a diario.

## 1.3 Reactivo de Fenoles de Folin y Ciocalteu:

Agregar en un matraz de 2 litros, 100 g de Tungstato de sodio, 25 g de molibdato de sodio y 700 ml de agua destilada. Cuando se ha disuelto las sales, agregar 50 ml de ácido ortofosfórico al 85 % y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado. Hervir con reflujo, suavemente durante 10 horas ( el material de vidrio utilizado para el aparato de reflujo debe tener todas sus uniones constituidas por vidrio esmerilado) (12.22).

Añadir luego 150 g de sulfato de litio, 50 ml de agua destilada y 26 3 gotas de bromo, hervir la mezcla durante 15 minutos en una campana de gases retirando el condensador, para separar el exceso de bromo ( se añade el bromo para reoxidar el reactivo que se ha reducido ligeramente). Enfriar, diluir hasta un litro y filtrar si es necesario. El reactivo debe de tener un color amarillo, sin tinte verdoso.

Conservarse en la nevera, si durante la conservación adquiere el color verde, hay que volverlo a tratar con bromo (12.22).

## 1.4 Reactivo de fenoles diluido:

Añadir 1 ml de reactivo concentrado a 50 ml de agua y titular con una solución 0.1 N de NaOH, utilizando fenolftaleína como indicador.

En estas condiciones el punto final de la titulación no es muy preciso, y se hace necesario proseguirla hasta que desaparece el color verde y se transforma en una tonalidad gris-rosado. Basándose en las cifras obtenidas con esta titulación, diluir el reactivo concentrado de forma tal que 1 ml del mismo sea equivalente a 9 ml de NaOH 0.1 N (generalmente se necesita una dilución aproximada del 50 %). Se suele aconsejar la preparación a diario del reactivo diluido, si no es estable en la nevera (descartarlo si adquiere un color verdoso) (12.22).

## Anexo No. 3

**Preparación de curva de calibración:**

Para realizar esto se preparan una serie de tubos de ensayo con soluciones de glucosa que van de 0 a 5.52 ppm a partir de una solución de 180 ppm, siguiendo el esquema que se presenta a continuación:

Tubo No.	MI de glucosa 180 mg/l	ml de buffer de fosfato 100 mmol/l	Concentración Final en ppm
A1	0.1	0.9	0.69
A2	0.2	0.8	1.39
A3	0.4	0.6	2.76
A4	0.5	0.5	3.45
A5	0.8	0.3	5.52
A6	0.0	1.0	0.00

Luego se toma una alícuota de cada ensayo realizado con lactasa inmovilizada, libre, y de cada patrón. Se le agregaran 5 ml de reactivo de glucosa oxidasa-proxidasa, Posteriormente se incubará por 15 minutos a 37 °C, en los tubos se producirá un compuesto de color verde, cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa presente, se procederá a leer la absorbancia en cada uno de los tubos a 610 nm, utilizando el tubo A6 como blanco para ajustar el 100 % de transmitancia ó 0 de absorbancia del Espectrofótometro (12.23).

## Anexo No. 4

~~-----~~ Método de desproteínización de Somogyi-Nelson.

## 3.1 Reactivos:

- Solución de sulfato de zinc 0.175 M (5%):

Se disuelven 50 g de sulfato de zinc en 200 ml de agua destilada, luego se transfiere cuantitativamente a un balón de aforado de 1 litro y se afore con agua destilada.

~~-----~~ Solución de hidróxido de bario 0.15 M:

Se disuelven 95 g de hidróxido de bario en 400 ml de agua destilada recientemente hervida y luego transfiere cuantitativamente a un balón aforado de 2 litros y afore con agua destilada. La solución debe de mantenerse protegida del aire porque de lo contrario absorberá  $\text{CO}_2$  del aire y formara carbonato de bario, si la solución presentase formación de carbonato de bario déjela reposar por unas horas y luego filtre o descante la solución cristalina (12.24).

## 3.2 Evaluación de concentraciones de reactivos.

Para evaluar la concentración del hidróxido de bario, tomar 10 ml de la solución de  $\text{ZnSO}_4$  y agregarlos a un beaker conteniendo 50 ml de agua destilada agregar 3 a 4 gotas de indicador de fenolftaleína en etanol y valore con la solución de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (12.24).

El punto final de la titulación será cuando aparezca una coloración gris-rosado, es recomendable que la titulación se lleva acabo lentamente, porque una titulación rápida podría indicar un punto final falso. Si las soluciones no son equivalentes se le agregara agua a la solución más concentrada y se repetirá la titulación (12.24).

### 3.3 Filtrado libre de Proteínas:

Para preparar el filtrado libre de proteínas se realiza el siguiente procedimiento:

- Se toma un volumen de leche y se agrega a un tubo de ensayo conteniendo 5 volúmenes de agua destilada.
- Luego se agregan al tubo 2 volúmenes de solución de hidróxido de bario y agite el tubo de ensayo, luego agregar 2 volúmenes de solución de sulfato de zinc y agite nuevamente el tubo de ensayo; espere 5 minutos y entonces filtre o centrifugue (12.24).

## Anexo No. 5

Tabla No. 5

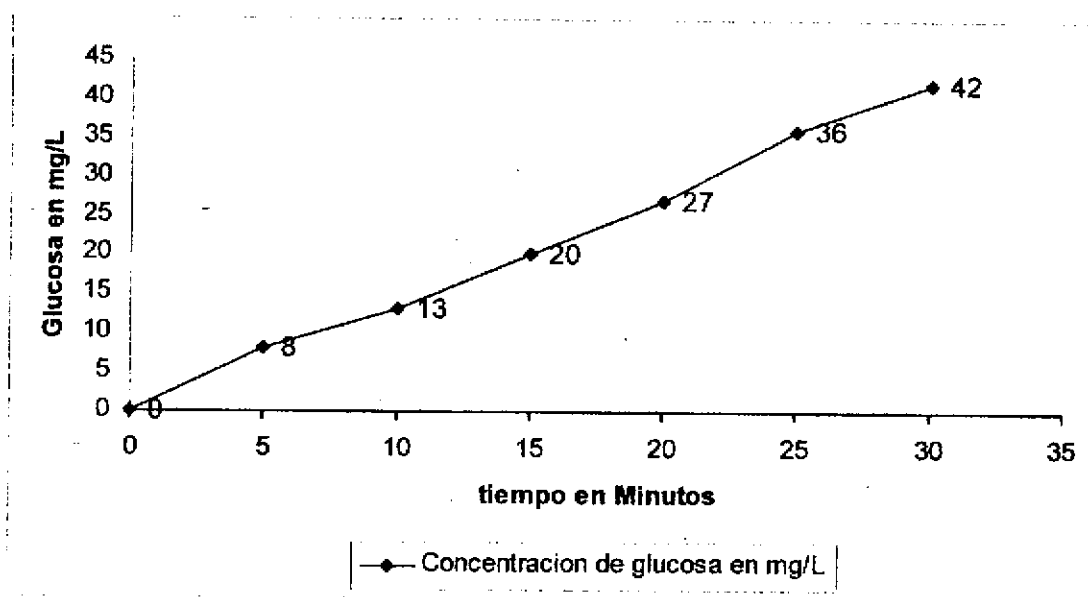
Prueba de actividad de lactasa soluble grado alimenticio en leche entera.

Aparecimiento del producto glucosa como resultado de la actividad de lactasa sobre lactosa de leche entera. Concentración de lactasa 6.05  $\mu\text{g/ml}$  que es igual a 0.01 nanocatalas; volumen de reacción 20 ml de leche entera.

Tiempo en Minutos	Concentración de glucosa en mg/L en la solución
0	0
5	8
10	13
15	20
20	27
25	36
30	42

Grafica No.1

Transcurso de la reacción basada en medición de glucosa producida por la acción de lactasa sobre la lactosa de leche entera en función del tiempo.



$$r = 0.9982$$

Orden de reacción con respecto a la lactosa: Pseudo orden.

$$r^2 = 0.9964$$

$$\text{Ecuación: } C = 1.4t - 0.143$$

Donde:  $t$  = tiempo en minutos y  $C$  = Concentración de glucosa en mg/l.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE GUAYMAS  
 GUAYMAS, GUAYMAS, GUAYMAS



Tabla No. 6

Los datos anteriores fueron calculados según los datos de la siguiente curva de calibración de glucosa:

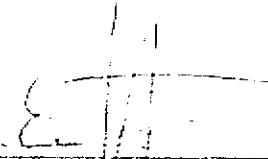
Concentración de glucosa en ppm	Absorbancia
0.00	0.000
0.69	0.041
1.39	0.081
2.76	0.150
3.45	0.220
5.52	0.300

$$r = 0.9939$$

$$r^2 = 0.9879$$

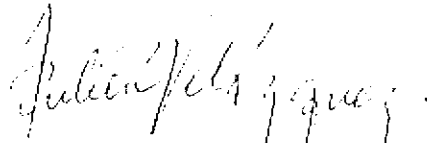
$$\text{Ecuacion: } A = 0.0556C - 0.00396$$

Donde A= Absorbancia y C= Concentración de glucosa en ppm.



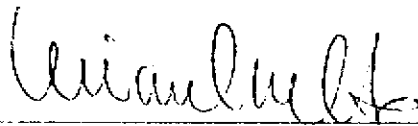
---

BR. ERICK JOSE VELASQUEZ CASTILLO  
AUTOR



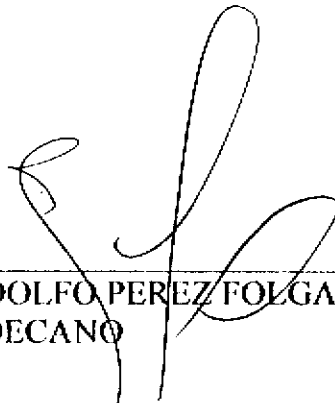
---

DR. RUBEN VELASQUEZ MIRANDA  
ASESOR



---

LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA  
DIRECTOR



---

LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR  
DECANO