

Inmovilización de lactasa microbiana

Immobilization of microbial lactase

ANDRES ILLANES, MARIA ELVIRA ZUÑIGA, ANDREA RUIZ

Escuela de Ingeniería Bioquímica, Universidad Católica de Valparaíso,
Casilla 4059, Valparaíso, Chile.

Lactase (β -D galactoside-galactohydrolase, E.C.3.2.1.23) is a relevant enzyme to the dairy industry as it modifies undesirable functional and nutritional properties derived from the lactose content in milk and dairies, and as a way of recovering or upgrading cheese whey. This latter aspect has been considered to develop an enzyme catalyst suitable for the continuous hydrolysis of whey permeate. The selection of enzyme and support and the immobilization procedure has been reported previously. Results obtained in the immobilization of fungal lactase on activated chitin have prompted us to scale-up the procedure, a system being developed in which the enzyme is immobilized within the reactor (*in situ*). Results are presented for the *in situ* immobilization of lactase with and without recirculation of the reagents. Previous procedure was reproduced, although moderate profiles of activity were generated through the catalyst bed which were not eliminated by recirculation. Packed bed reactors with immobilized lactase were operated at varying flowrates and lactose concentrations, results being compared, in terms of substrate conversion and reactor productivity, with a theoretical model based on the corresponding kinetic expression and ideal flow regime. Deviations are significant at high flowrates which is attributed to backmixing and channeling through the catalyst bed. The model fits reasonably well at low flowrates and high feed substrate concentration. Productivity was 58 g of glucose/l.h at 40 ml/h of 120 g/l of lactose. Stability of the immobilized lactase was assessed in long-term reactor operation with whey permeate (35 g/l of lactose) at 40°C and pH 4.0. Operational half-life was 120 days.

La lactasa (β -D galactosido-galactohidrolasa, E.C. 3.2.1.23) es la enzima responsable de la hidrólisis de la lactosa o azúcar de leche a glucosa y galactosa.

La lactosa, no obstante su valor nutricional, confiere propiedades indeseables a los alimentos que la contienen como con-

secuencia de su baja solubilidad, bajo poder edulcorante, sabor ofensivo y, en algunos casos, problemas de intolerancia digestiva (1).

Estos problemas pueden ser superados, en gran medida, a través de un proceso de hidrólisis enzimática, lo que confiere a la lactasa un alto potencial de aplicación en la industria láctea para la elaboración de leches delactosadas (2), el ennoblecimiento del suero (3) y la recuperación del permeado de suero de quesería (4).

Cantidades crecientes de proteína de suero están actualmente siendo recuperadas en la industria láctea nacional, mediante la tecnología de ultrafiltración, generándose una corriente residual, denominada permeado de suero, que puede ser hidrolizado y concentrado para producir un jarabe de gran potencial de uso en la industria alimentaria. Sólo una parte del suero de quesería es actualmente utilizado en la formulación de alimentos, eliminándose el resto como tal o como permeado de suero, lo que genera contaminación dado su

NOMENCLATURA

F	Flujo de operación del reactor	(l min)
K	Constante de Michaelis de sustrato	(mM)
K _I	Constante de inhibición por galactosa	(mM)
P	Masa de catalizador	(g)
s	Concentración de sustrato en la salida del reactor	(mM)
s _i	Concentración de sustrato en la alimentación del reactor	(mM)
V	Velocidad máxima de reacción	(m moles/min · g)
V _R	Volumen del reactor ocupado por el líquido	(l)
X	Grado de conversión de sustrato = $\frac{s_i - s}{s_i}$	
π	Productividad del reactor enzimático	(g/l.h)

elevado nivel de demanda bioquímica de oxígeno (5).

Debido a la alta incidencia del costo del catalizador enzimático en el costo global de un proceso dado, resulta fundamental incrementar su eficiencia de uso, lo que puede lograrse a través de la tecnología de inmovilización.

Se presentan los resultados obtenidos en la producción, caracterización y utilización de un catalizador de lactasa fungal inmovilizada de bajo costo para la hidrólisis continua de permeado de suero de quesería.

MÉTODOS

Como soporte se seleccionó quitina en escamas, obtenida de caparazones de crustáceos (6, 7), debido a sus buenas propiedades mecánicas y su elevada estabilidad química y biológica, y su adecuada reactividad hacia agentes bifuncionales. Como base de fabricación del catalizador se seleccionó la lactasa fungal de Enzyme Development Corporation (New York, EE.UU.) proveniente de *Aspergillus oryzae*, en base a criterios de costo por unidad de actividad y actividad específica del preparado (8). Como agente activador se empleó glutaraldehído al 25% (v/v) adquirido de SIGMA Chemical Co. (St. Louis, EE.UU.). Los demás reactivos fueron de grado analítico. Como sustrato se utilizó lactosa U.S.P. (Droguería Michelson, Santiago, Chile) o permeado de suero demineralizado (35 g/l de lactosa), proporcionado por Dos Alamos S.A.C.I. (Santiago, Chile).

La actividad enzimática fue expresada en unidades internacionales (u) a 55°C, pH 4,0 (4,5 para la enzima soluble) y 200 g/l de lactosa. La lactosa hidrolizada fue determinada a partir de la glucosa producida, analizada con el kit 510-A de SIGMA Chemical Co.

Se ha reportado previamente el esquema básico de inmovilización y la optimización del proceso bajo el criterio de maximizar la actividad específica del catalizador sólido (unidades de actividad expresada por unidad de masa de soporte) a rendimientos de inmovilización (fracción de la actividad total contactada que es expresada en el catalizador sólido) por sobre mínimos preestablecidos (8).

El proceso contempla una etapa de activación de la quitina con el reactivo bifuncional glutaraldehído y una etapa de contactación de la enzima soluble con el soporte de quitina activada.

Los reactores enzimáticos utilizados en la evaluación experimental del catalizador producido fueron columnas de vidrio, provistas de chaquetas de circulación de agua con control de temperatura y elementos soportantes del lecho de catalizador. La alimentación y descarga de los reactores se efectuaron mediante bombas peristálticas de flujo controlado.

RESULTADOS

El protocolo básico de inmovilización (8) ha sido modificado a través de la inclusión de una etapa de pretratamiento de la quitina mediante ácido acético (0,4 ml/g de quitina) por 30 minutos a 50°C, obteniéndose consistentemente valores por sobre las 400 u/g de quitina y rendimientos del 35%. El esquema de inmovilización se presenta en la Fig. 1.

Los resultados finales de la optimización del proceso de inmovilización se presentan en la Fig. 2. Los valores reportados corresponden a aquellos obtenidos a la razón óptima glutaraldehído/quitina (G/Q) de 1,5 g al 25%/g obtenida en la etapa de activación y muestran el efecto de la razón enzima contactada/quitina (E/Q) en el rendimiento de inmovilización (R) y la actividad específica (A) del catalizador obtenido.

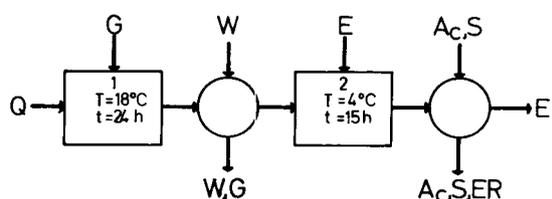


Fig. 1: Esquema de inmovilización de lactasa en quitina indicando las etapas de activación del soporte y contactación de la enzima soluble con el soporte activado. Q: quitina; G: glutaraldehído; E: lactasa soluble contactada; EI: lactasa inmovilizada; ER: lactasa soluble residual; W: agua destilada; Ac: tampón acetato 0,1 M, pH 4,0; S: cloruro de sodio 0,02 M; T: temperatura; t: tiempo de contacto.

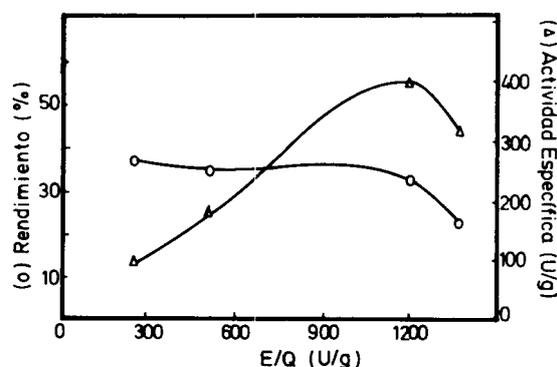


Fig. 2: Rendimiento de inmovilización (%) y actividad específica (u/g) de lactasa inmovilizada en función de la razón enzima contactada-quitina: E/Q (u/g). Valores obtenidos a la razón óptima glutaraldehído-quitina de 1,5 g 25%/g.

Con miras al escalamiento del proceso a nivel productivo se desarrolló una metodología de inmovilización *in situ* (en el reactor) donde las operaciones descritas en la Fig. 1 se desarrollan dentro del reactor donde la enzima será utilizada, lo que permite una manipulación eficiente y sanitaria del sistema. Los resultados de la inmovilización *in situ* con y sin recirculación de reactivos a través del lecho de soporte se presentan en la Tabla I. La velocidad de recirculación fue de 1,45 cm³/cm² · min para producir una expansión del lecho de soporte del 50%.

TABLA I

Inmovilización *in situ* de lactasa en quitina
G/Q = 1,25 g 25%/g; E/Q = 1.200 ± 50 u/g)

	Con recirculación (1,45 cm ³ /cm ² min)		Sin recirculación	
	A (u/g)	R (%)	A (u/g)	R (%)
Tope	434,3	36,1	303,8	25,2
Centro	334,9	27,8	392,9	32,6
Fondo	322,3	26,8	508,0	42,2
Promedio	363,8	30,2	401,6	33,3

Los parámetros cinéticos de la lactasa soluble y de la lactasa inmovilizada en quitina a través del protocolo optimizado se resumen en la Tabla II. Los valores fueron determinados por métodos de linealización y de regresión no lineal (9). Dado que el efecto complejo de glucosa es muy moderado (a), el comportamiento cinético puede representarse adecuadamente a través de un modelo de inhibición competitiva total por galactosa, que para un reactor continuo de lecho fijo con la enzima inmovilizada da origen a la siguiente expresión que predice el comportamiento ideal de dicho reactor (10).

$$\frac{VP}{KF} = s_i X \left(\frac{1}{K} - \frac{1}{K_I} \right) - \left(1 + \frac{s_i}{K_I} \right) \ln(1 - x) \quad (1)$$

(a) Experimentos no publicados.

$$\pi = \frac{s_i X}{V_R} F \quad (2)$$

TABLA II

Parámetros cinéticos de lactasa soluble (L) y de lactasa inmovilizada en quitina (LIQ)

Catalizador	L	LIQ	LIQ
Temperatura; pH	55°C; 4,5	55°C; 4,0	40°C; 4,0
K (mM)	90	87	91
K _I (mM)	9,5	20,3	14,7
V (m moles/min · g)	20*	0,365**	0,332**

* Valor expresado por gramo de preparado enzimático soluble
** Valor expresado por gramo de catalizador sólido.

La Fig. 3 muestra los resultados obtenidos en experiencias realizadas en reactores de lecho fijo, diseñadas para obtener un grado de conversión inicial de sustrato a producto del 90%, a distintos flujos de operación y concentraciones de lactosa en la alimentación.

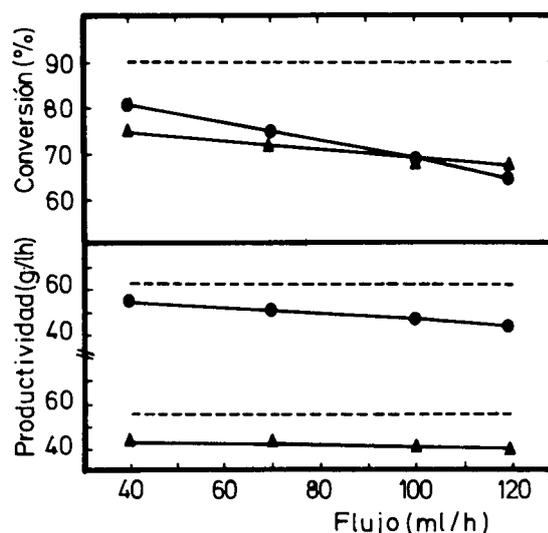


Fig. 3: Comportamiento de reactores de lecho fijo con lactasa inmovilizada en quitina a distintos flujos y concentraciones de sustrato de alimentación, a 55°C y pH 4,0. La conversión de sustrato es expresada como porcentaje; la productividad como gramos de glucosa producidos por litro de reactor por hora de operación. —: valores experimentales; ----: valores de diseño obtenidos de las ecuaciones (1) y (2); ▲ = 35 g/l de lactosa; ● = 120 g/l de lactosa.

La Fig. 4 muestra los resultados de estabilidad del catalizador obtenidos en experiencias continuas prolongadas a 40°C empleando permeado de suero demineralizado como sustrato. El esquema de operación incluye lavados diarios de 20 minutos con solución sanitizante. Asumiendo un decaimiento de la actividad enzimática de primer orden, los resultados permiten predecir un tiempo de vida media operacional de 120 días.

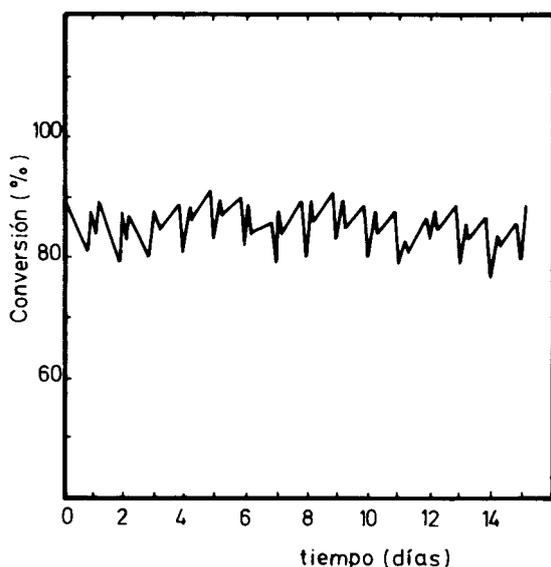


Fig. 4: Estabilidad operacional de lactasa inmovilizada en quitina. Condiciones de operación del reactor: 40°C, pH 4,0; 72 ml/h de permeado de suero demineralizado con 37 ± 2 g/l de lactosa y una carga enzimática de 4.730 u. La sanitización se realizó una vez al día con 0,1% de ácido acético y 0,05% de cloruro de alquil bencil dimetil amonio.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la optimización del proceso de inmovilización (Fig. 2) pueden considerarse satisfactorios tanto en términos de actividad específica como de rendimiento (11). Aun cuando se dispone en la actualidad de catalizadores comerciales de lactasa inmovilizada con actividades de hasta 2.000 u/g (12), se trata de productos de un costo muy elevado elaborados a partir de enzimas altamente purificadas y cuyas licencias de uso están frecuentemente vinculadas a la adquisición de paquetes tecnológicos. El catalizador elaborado se

produce a partir de materias primas de bajo costo y gran disponibilidad, lo que le permite compararse favorablemente, en términos de costo, del catalizador por unidad de producto producido. Al desarrollar la inmovilización *in situ* se observaron moderados gradientes de actividad de tope a fondo del lecho catalítico, los que se intentaron minimizar mediante recirculación de los agentes de inmovilización.

Como se muestra en la Tabla I los gradientes se invirtieron, lo que sugiere la existencia de una velocidad de recirculación adecuada más baja. No obstante, la existencia de perfiles moderados no afecta significativamente el comportamiento del reactor, el que depende más de la carga enzimática total que de su distribución. Los resultados obtenidos son levemente superiores sin recirculación, aun cuando las diferencias son poco significativas, resultando de todas formas conveniente esta modalidad dada su mayor simplicidad.

El procedimiento de inmovilización *in situ* ha sido escalado a nivel piloto, habiéndose reproducido los resultados con valores de actividad específica de 450 ± 30 u/g.

El comportamiento cinético de la enzima inmovilizada resultó ampliamente satisfactorio, según se desprende de los resultados en la Tabla II. La constante de Michaelis de sustrato obtenida está dentro de los rangos reportados para lactasas fungales, siendo destacable que el valor obtenido es similar al de la enzima soluble, lo que muestra que los efectos microambientales adversos propios de la catálisis en fase heterogénea son poco significativos en este caso (13). Por su parte, los valores de la constante de inhibición competitiva por galactosa indican que la inmovilización hace a la enzima menos sensible a inhibición, lo que es muy favorable respecto de la aplicación del catalizador.

La evaluación experimental del catalizador en reactores de lecho fijo (Fig. 3) muestra una desviación significativa del modelo matemático desarrollado en base a un régimen de flujo ideal y ausencia de restricciones difusionales (ec. 1). Las desviaciones son más pronunciadas a mayores flujos y menores concentraciones de lactosa de alimentación, lo que sugiere la existencia

de un cierto grado de retromezclamiento y canalización a través del lecho catalítico y de limitaciones al transporte del sustrato desde el seno del líquido a la superficie del catalizador. La productividad del reactor aumentó con la concentración de lactosa en la alimentación, según predicen las ecuaciones (1) y (2), lo que aconseja la preconcentración del permeado de suero antes de la hidrólisis. La estabilidad del catalizador puede considerarse satisfactoria para la hidrólisis continua de permeado de suero a nivel industrial y es, a lo menos, comparable a las obtenidas con lactasas inmovilizadas comerciales (b). No se observó elución de enzima ni contaminación microbiana durante toda la operación del reactor.

Los resultados presentados y las experiencias preliminares desarrolladas a nivel piloto son muy prometedores, tanto desde la perspectiva de producción del catalizador como de su aplicación a nivel industrial.

El jarabe de permeado hidrolizado producido ha sido satisfactoriamente evaluado en diversos productos alimenticios (14), debiendo aún comprobarse su competitividad frente a edulcorantes convencionales. La rentabilidad de producir permeado de suero hidrolizado dentro de una industria lechera en Chile mediante el catalizador desarrollado, ha sido evaluada a través de un estudio de prefactibilidad técnico-económica, obteniéndose resultados auspiciosos (15).

RESUMEN

La lactasa tiene un gran potencial de aplicación en la industria láctea como modificador de propiedades funcionales y nutricionales de leche y derivados y como agente de recuperación del suero de quesería. Este último aspecto se ha abordado a fin de producir y utilizar catalizadores enzimáticos para la hidrólisis continua de permeado de suero. La selección de enzima y soportes y la optimización de la metodología de inmovilización ya han sido reportadas. Los resultados obtenidos con lactasa

inmovilizada en quitina han motivado el intento de escalar los procedimientos a nivel productivo. Un primer objetivo ha sido el desarrollo de un sistema de inmovilización en el reactor (*in situ*) adecuado a la operación en planta. Se presentan los resultados de inmovilización *in situ* en sistemas por lote cerrado y con recirculación. Los resultados del protocolo de inmovilización original optimizado son reproducibles, si bien se observan gradientes de actividad enzimática a lo largo del reactor, las que no se logra eliminar por recirculación de reactivos. Se presenta los resultados de operación de reactores continuos de lecho fijo con lactasa inmovilizada *in situ*, operando a distintos flujos y concentraciones de lactosa. Los grados de conversión y productividad obtenidos se comparan con un modelo simple, desarrollado en base a la expresión cinética correspondiente y un régimen de flujo pistón. La desviación es significativa a flujos de operación altos, lo que se atribuye a retromezclamiento y canalización a través del lecho catalítico, obteniéndose un mejor ajuste a flujos bajos y altas concentraciones de sustrato de alimentación. La productividad fue máxima a 120 g/l de lactosa y 40 ml/h e igual a 58 g de glucosa/1.h. La estabilidad del catalizador fue evaluada en el reactor a pH 4,0 y 40°C con permeado de suero, calculándose un tiempo de vida media operacional de 120 días.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados obtenidos forman parte del proyecto 390/87 financiado por FONDECYT. Se agradece la colaboración de Dos Alamos S.A.C.I. por el suministro de materias primas y reactivos y uso de la planta piloto y, en particular, al ingeniero Sr. Hugo Torti por su colaboración y apoyo.

REFERENCIAS

- MARCONI, W.; MORISI, F. (1979) En *Applied Biochemistry and Bioengineering 2* (Wingard, L.; Katchalsky-Katzir, E.; Goldstein, L., eds.). New York, Academic Press, pp. 219-258.
- HOLSINGER, V. (1978) *Food Technol.* 32: 35-40.
- SPROSLER, B.; PLAINER, H. (1983) *Food Technol.* 37: 93-96.
- VAN GRIETHUYSEN-DILBER, E.; FLASCHEL, E.; RENKEN, A. (1988) *Process Biochem* 23: 55-59.

(b) Experimentos no publicados.

5. MARWAHA, S.; KENNEDY, J. (1988) *J. Food Science & Technol.* 23: 323-336.
6. MUZZARELLI, R. (1977) *Chitin*. Oxford, Pergamon Press, pp. 62-95.
7. ILLANES, A.; CHAMY, R.; ZUÑIGA, M. (1985) En: *Chitin in Nature and Technology* (Muzzarelli, R.; Jenniaux, C.; Gooday, G. eds.). New York, Plenum Press, pp. 411-415.
8. ILLANES, A.; ZUÑIGA, M.; CHAMY, R.; MARCHESI, M. (1988) En: *Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells* (Moo-Young, M. ed.). London, Elsevier Applied Science, pp. 233-249.
9. OESTREICHER, E.; PINTO, G. (1987) *Comput. Biol. Med.* 17: 53-58.
10. ILLANES, A. (1986) En: *Curso de Biotecnología. Actas del II Curso Latinoamericano de Biotecnología*. Valparaíso, Ediciones Universitarias de Valparaíso, pp. 307-350.
11. CHIBATA, I. (1978) *Immobilized Enzymes*, New York, Halsted Press, 284 pp.
12. ANONIMO (1985) Sumitomo Technical Information Bulletin on Immobilized Sumylact Nº IML-85-3. Osaka. Sumitomo Chemical Co. Ltd.
13. ENGASSER, J.; HORVATCH, C. (1976) En: *Applied Biochemistry and Bioengineering 1* (Wingard, L.; Katchalsky-Katzir, E.; Goldstein, E. eds.). New York, Academic Press, pp. 128-220.
14. SANDOVAL, S. (1988) *Obtención de jarabe de lactosa hidrolizada y utilización en formulación de helados de crema de frutilla*. Memoria para obtener el título de Ingeniero de Alimentos, Universidad de Chile, 112 pp.
15. ZUÑIGA, M.; ILLANES, A.; AYALA, F.; LOPEZ, R. (1989) *Anales del Primer Congreso Nacional de Biotecnología*, Talca, p. R-25.