

ACTIVIDAD β -GALACTOSIDÁSICA DE ALGUNAS ENZIMAS COMERCIALES

Jairo Quijano T.¹, Doris L. Guerra T.²

Palabras claves: Hidrolasas, Glicosidasas, Lactasa, β -Galactosidasa.

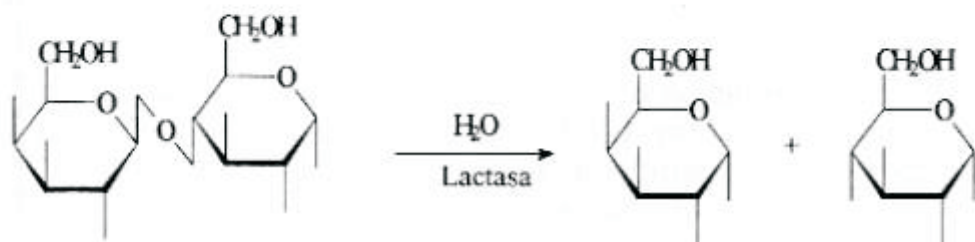
Abstract: The β -Galactosidic activities of several commercial enzymes are presented, also the cinetic paremeters of the most active enzyme.

Resumen: Se presenta la actividad β -Galactosidásica de algunas enzimas utilizadas en la industria lactea para la hidrólisis del disacárido lactosa, así como los parámetros cinéticos de la enzima más activa.

INTRODUCCIÓN

La Enzima Lactasa (E.C. 3.2.1.23, β -D-Galactósida galactohidrolasa), cataliza la hidrólisis del enlace β -D-

galactosídico de la lactosa liberando un mol de D-Glucosa y un mol de D-Galactosa por cada mol de lactosa.



Jairo Quijano T., Doris L. Guerra T.

¹ Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Apartado 3840, Medellín-Colombia. E-mail: jquijano@cpm.net.co

² Departamento de Química, Universidad de Antioquia, Apartado 1226, Medellín-Colombia.

Industrialmente se usa principalmente en la producción de:

- Leche deslactosada, para la alimentación de niños y adultos intolerantes a la lactosa durante el proceso.
- Arcuque o dulce de leche, para evitar la cristalización de la lactosa durante el proceso y dar plasticidad al producto.
- Helados (Ice cream) evitando también la cristalización de lactosa y por ende la consistencia arenosa de la crema.
- Quesos procesados: cottage, cheddar.

La lactasa está ampliamente distribuida: Se encuentra en la emulsina de algunas Rosáceas⁽¹⁾ (Almendro, duraz-

no, manzana, albaricoque), semillas de alfalfa⁽²⁾ y de café⁽³⁾, algunos tipos de rosas silvestres⁽⁴⁾. Está presente en *Aspergillus oryzae* (takadiastasa)⁽⁵⁾, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Escherichia coli*⁽⁶⁾⁽⁷⁾, *Saccharomyces fragilis*⁽⁸⁾, *Neurospora*⁽⁹⁾ y algunos otros microorganismos⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾.

En animales se ha encontrado en el caracol de tierra (*Helix pomatia*) y en el intestino delgado de algunos mamíferos⁽¹²⁾⁽¹³⁾.

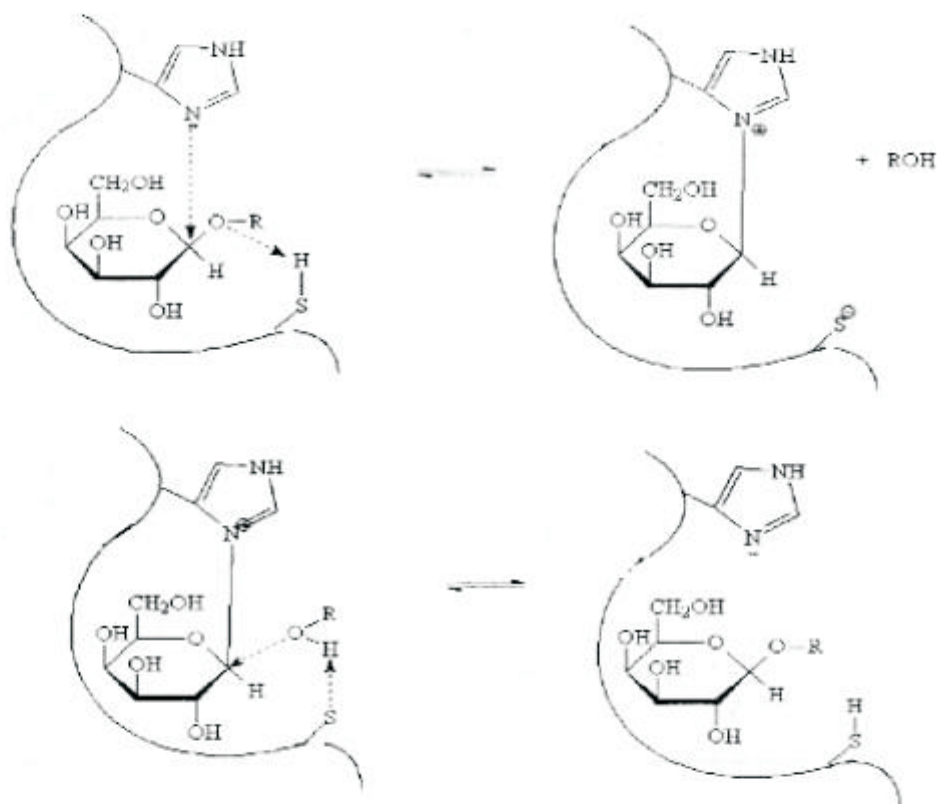
Estudios de inhibición y actividad vs. pH, han demostrado la presencia de dos grupos: sulfhidrilo o imidazol, en el sitio activo de la enzima de *E. coli*.

Wallenfels y Malhotra han propuesto el mecanismo mostrado haciendo una analogía con el de las esterasas⁽¹⁴⁾.

LABORATORIO ESPECIALIZADO DE ANALISIS (LEA)

Presta el servicio de verificación de la calidad a materias primas, medicamentos, alimentos, cosméticos y similares

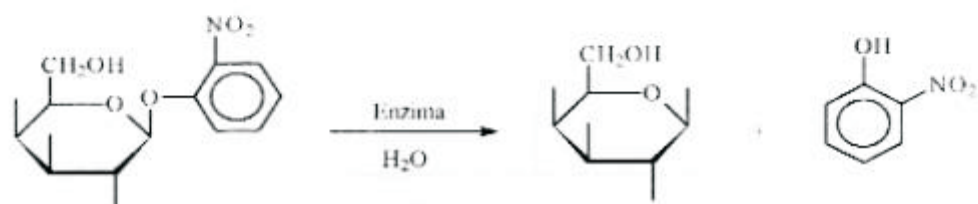
Mayores Informes
En el Telefax: 210 54 56



Jairo Quijano T., Doris L. Guerra T.

Con el fin de evaluar la calidad de las enzimas a utilizar en el deslactosaje de la leche, o en otro uso industrial, es necesario conocer su actividad. Esta puede ser estimada con lactosa como sustrato, siguiendo enzimáticamente la formación de glucosa^{(15) (16)} En nues-

tro caso utilizamos el cromógeno o-nitrofenil-β-D-galactósido (ONPG)⁽¹⁷⁾, que también es hidrolizado por la enzima, siguiendo la liberación de o-nitrofenol espectrofotométricamente a 410 nm. La reacción se llevó a cabo a pH=4.4 y 37°C.



PARTE EXPERIMENTAL

Dos mL de ONPG de concentración conocida, 1 mL de solución buffer de fosfato-citrato pH = 4.4 y 1 mL de solución de enzima, se incuban a 37°C por 20 minutos, al cabo de los cuales se agrega 1 mL de solución alcalina (Na_2CO_3 -EDTA) para detener la reacción y desarrollar el color se lee absorbancia a 410 nm frente a un blanco que contiene agua en lugar de enzima⁽¹⁸⁾.

Para evaluar la real actividad β -Galactohidrolásica de algunas enzimas que se ofrecen comercialmente en nuestro medio así como de otra hidrolasa no específica para el enlace β -galactosídico (invertasa: β -D-

frucosifuranosidasa), se trabajó con: Takamine Brand Fungal Lactase 30.000 (Fungal), Lactasa Miles Gynl 50 (Gynl), Maxilact L 2000 (Maxilac), Invertasa-S (Invertasa).

Con el fin de hacer una comparación reproducible, se cuantificó la concentración en mg de proteína/ mL de solución (Método Biuret)⁽¹⁹⁾, de las enzimas con esta presentación. Igualmente a la enzima sólida (Fungal) se le averiguó la pureza en términos de mg de proteína/mg totales.

RESULTADOS

a) Actividades

Los resultados están presentados en la tabla 1.

TABLA 1

Enzima	Presentación comercial	mg Proteína ml. de solución	Actividad $\frac{\mu\text{mol ONPG}}{10^5 \text{ min mg Prot.}}$
Maxilact	Solución	50	3.43
Invertasa	Solución	30	3.04
Gynl	Solución	147.2	0.46
Fungal(Lactasa)	Sólido	81.6*	5.12

* mg Proteínas/100 mg totales

b) Parámetros cinéticos

Con la enzima Fungal, se hicieron las correspondientes mediciones cinética (Michaelis Menten) para evaluar la

constante de Michaelis (K_m) y la velocidad máxima (V_m). Igualmente se utilizó D-Galactosa como inhibidor competitivo. Los resultados están mostrado en la tabla 2.

TABLA 2

Parámetros cinéticos en la hidrólisis de ONPG con Fungal-Lactasa

K_m (M)	3.46×10^{-4}
V_m ($\mu\text{mol ONPG}/\text{mg enzima min}$)	9.60×10^{-2}
K'_m (M)	6.81×10^{-4}
K_i (M)	6.80×10^{-2}

CONCLUSIONES

Los valores de actividad obtenidos, muestran que es necesario previamente a la utilización de enzimas, cuantificar la actividad para escoger adecuadamente la más conveniente. Aunque las enzimas tienen especificidad, puede ensayarse otra similar (como en el caso de la invertasa) para pesquisar su probable eficiencia.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Proenzimas y Girst-Brocades, quienes facilitaron las enzimas comerciales.

A los Departamentos de Química de la Universidad Nacional de Medellín y Antioquia por las facilidades brindadas para realizar la parte experimental.

REFERENCIAS

- (1) E. Bourquelot and H. Hérissey, *Compt rend. acad. sci.* **137**, 56 (1903)
- (2) E. Hoffman, *Biochem. Z.* **267**, 309 (1933).
- (3) K. Hill, *Verhandl. sächs. Akad. Wiss. Leipzig. Math. phys. Kl.* **86**, 115 (1934) [C.A. 28, 5843 (1934)].
- (4) B. Helferich and F. Vorsatz, *Z. physiol. Chem.* **237**, 254 (1935).
- (5) C. Neuberg and O. Rosenthal, *Biochem. Z.* **145**, 186 (1924).
- (6) E. Hofmann, *Biochem. Z.* **272**, 133 (1934).
- (7) C.J. Deere, A.D. Dulancy, and I.D. Michelson, *J. bacteriol.* **37**, 355 (1939).
- (8) B. van Dam, J.G. Revallier-Warffenus, and L.C. Van Dam-Scherhorn, *Neth. Milk dairy J.* **4**, 1996 (1950) [C.A. 44, 10000 (1950)].
- (9) O. E. Landman, *ABB* **52**, 93 (1954).
- (10) K. Nisizawa, *J. Fac. Textile Sericult. Shinshu Univ.* **1**, 213 (1951).
- (11) M. Cohn, *Bacteriol. Revs.* **21**, 140 (1957).
- (12) Ch. Porcer, *Compt. rend. acad. sci.* **140**, 1406 (1905).
- (13) F. A. Cajori, *Am. J. Med Sci.* **187**, 295 (1934).
- (14) D.E. Koshland, Jr., in "Symposium on the Mechanism of Enzyme Action" (W.D. McElroy and Glass, eds.), p. 608. Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954.
- (15) K. Wallenfels, M.L. Zarnitz, G. Laule, H. Bender, and M. Keser, *Biochem. Z.* **331**, 459 (1959).
- (16) G. Pflleiderer and L. Grein, *Biochem. Z.* **328**, 449 (1957)
- (17) M. Cohn and J. Monod, *BBA* **7**, 153 (1957).
- (18) J. Lederberg, *J. Bact.* **60**, 38 (1960).
- (19) J. Quijano y G.J. Arango "Bioquímica Experimental" p.34, Universidad de Antioquia, 1984.