



PROCESO DE OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE β -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces lactis*

HÉCTOR CASTILLO RUIZ¹, JUAN ALFREDO SALAZAR MONTOYA¹ y EMMA GLORIA RAMOS RAMÍREZ¹
1 CINVESTAV-IPN, UNIDAD ZACATENCO. eramos@cinvestav.mx

La β -D-galactosidasa (β -D-galactohidrolasa EC 3.2.1.23), conocida como lactasa, es una enzima ampliamente utilizada en la industria alimenticia, ya que cataliza la hidrólisis de terminales no reductoras de residuos de β -D- galactósidos en β -D-galactosa. El ejemplo más común es la hidrólisis de la lactosa en galactosa y glucosa para la producción de derivados lácteos libres de lactosa. La β -galactosidasa juega un papel importante en los procesos biológicos de diferentes organismos, bacterias, hongos, levaduras, plantas y sus propiedades de la β -galactosidasa dependen de la fuente de donde es obtenida la enzima ya que aun con la misma actividad, el mecanismo de reacción puede cambiar o ser estable a distintas condiciones. La estructura de la enzima β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (KL- β -GAL), perteneciente a la familia GH2, está conformada por un homo-oligómero de cuatro subunidades. La caracterización enzimática de esta proteína depende, además del sustrato, de las condiciones del medio de reacción, como: temperatura, pH, tipo de buffer, presencia y concentración de iones. Con el objetivo de optimizar la funcionalidad de la enzima, se buscaron las mejores condiciones de temperatura y pH para la caracterización empleando cinéticas enzimáticas a partir de la hidrólisis de lactosa.

Se caracterizó la enzima KL- β -GAL, determinando tanto sus condiciones óptimas de uso como sus parámetros cinéticos. Para determinar las condiciones óptimas de la KL- β -GAL se determinó la velocidad inicial de reacción de hidrólisis de una solución de lactosa 50mM preparada en buffer de fosfatos 50mM a un pH variable según el experimento (entre 7 y 7.8). A la solución de sustrato se le adicionaron 10 μ L de la solución comercial de β -galactosidasa y se incubó a diferentes temperaturas (entre 25 y 45 °C). Se cuantificó la hidrólisis de lactosa indirectamente por producción de glucosa empleando la reacción de Trinder con reactivo GOD/PAP. Las mediciones se realizaron a 546 nm y cada uno de los ensayos se realizó por triplicado. Para determinar los parámetros cinéticos se realizaron cinéticas tipo Michaelis-Menten de 5-150mM de lactosa como sustrato y se estudió la influencia del ión Mg²⁺ en la reacción.

Con los resultados obtenidos se construyó la superficie de respuesta y su contorno, con lo que se determinaron las condiciones óptimas de funcionamiento la enzima de 35.2°C y pH 7.66 y los parámetros cinéticos correspondientes: sin Mg²⁺ una K_M de 39.22 \pm 7.67 mM, V_{max} =0.579 \pm 0.0365 mM \cdot min⁻¹ con Mg²⁺ una K_M de 30.96 \pm 2.91 mM, V_{max} =0.6017 \pm 0.0167 mM \cdot min⁻¹. Estos resultados permitirán el uso potencial de la enzima en procesos industriales en los cuales las variables del proceso puedan afectar los parámetros cinéticos.