XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
SIPAL Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras
VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras

ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES DE SECADO DEL CLORURO DE LISOZIMA EXTRAÍDA DE LA CLARA DE HUEVO.

Caro-González, Ivonne M[1]; Absalón, Ángel; Morales, José Andrés[2] y Cortés-Espinosa Diana V. [1]Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-IPN. Carretera. Estatal Tecuexcomac Tepetitla, Km 1.5, Tepetitla de Lardizábal, Tlax. C.P. 90700. Fax: (248)4870766. [2]Investigación Aplicada S.A. de C.V.
E-mail: dcortes@ipn.mx

Palabras clave: Cloruro de lisozima, liofilización, actividad enzimática.

Introducción. El cloruro de lisozima (Lis-HCl) es usado como agente inhibidor de bacterias Gram(+) en la industria del vino y quesos por su propiedad de hidrolizar la pared celular[(1)]. Por lo cual debe extraerse con altos grados de pureza y buena estabilidad para su conservación. Para ello se usan procesos de secado con agentes protectores (AP) que permitan la conservación de su estructura nativa y actividad enzimática conservando su estructura terciaria por puentes de hidrógeno, algunos azúcares sirven para esta función. El mecanismo de protección por los azúcares y los iones cloruro es debido a su propiedad de actuar como secuestrantes de radicales libres formados por estrés mecánico, el cual ocurre durante la liofilización[(2)].
Por lo que el objetivo general es estandarizar las condiciones de secado de Lis-HCl bajo las cuales se conserven sus propiedades catalíticas para su aplicación como conservador en la industria alimentaria.

Metodología. La lisozima se obtuvo de la clara de huevo por un método de extracción que permite obtener la proteína con altos grado de pureza y altos rendimientos, posteriormente se obtiene el Lis-HCl para su secado liofilización. El secado se realizó a -46°C y una P= 133x10^{-3}mbar usando como AP sacarosa y glucosa a diferentes relaciones proteína/azúcar (1:1, 1:3 y 1:5). La concentración de Lis-HCl fue de 10 mg/mL. Al polvo seco se le midió % de humedad y peso seco. Se determinó actividad enzimática por el método de Shuger[(3)], rendimiento por HPLC, pureza por SDS PAGE y contenido de cloruros por titulación.

Resultados y discusión. Los resultados de actividad enzimática del Lis-HCl después del secado se muestran en la tabla 1. Ninguno de los AP ni las diferentes relaciones probadas presentaron diferencia significativa sobre la actividad enzimática de la proteína. Antes del proceso de secado la enzima presentó una actividad de 44,687 U/mg y después del secado se perdió aproximadamente un 10% de la actividad, por lo que la adición de los AP sirve para evitar la desnaturalización de la estructura terciaria de la proteína.
Con el análisis de HPLC (fig. 1) se cuantificó la Lis-HCl liofilizada, obteniéndose aproximadamente el 85% de rendimiento, para evitar pérdidas es necesario aumentar la concentración de sólidos en la solución a liofilizar, ya que con esto se disminuirá el tiempo de secado.

Tabla 1. Actividad enzimática de lis-HCl liofilizada (U/mg de proteína) con diferentes relaciones de agentes protectores.

Relación proteína/azúcar		*1:1*	*1:3*	*1:5*
Lisozima-HCl liofilizado	*Sacarosa*	*39458*	*39986*	*39120*
	Glucosa	*39348*	*39106*	*38654*

Por SDS PAGE (Fig. 2) se verificó la pureza de la proteína, observándose que durante la etapa de cloración se eliminan algunas proteínas de la clara que no se eliminan con el proceso de extracción.

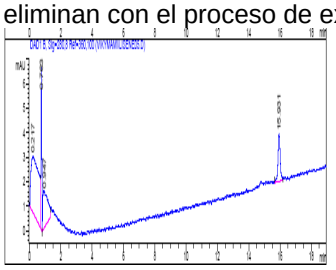

Fig. 1 cromatograma de Lisozima-HCl *liofilizada con sacarosa*

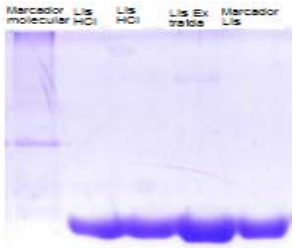

Fig. 2 Gel de SDS-PAGE de *lisozima-HCl dializada*

Conclusiones. La adición de agentes protectores confiere estabilidad a la proteína. La lisozima se obtuvo con buenos rendimientos después del proceso de secado. El proceso de liofilizado con diferentes concentraciones y agentes protectores no presentaron efectos negativos sobre la actividad de la enzima.

Agradecimiento. Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo y a la empresa Investigación Aplicada S.A. de C.V. (IASA) por el apoyo brindado para la elaboración de este proyecto.

Bibliografía.

1. Fernandez, B. (1998). Los problemas durante la liofilización. Cuándo suceden y como evitarlos. *Liofilizacion de Productos Farmaceuticos*. Frenández B. UTEHA Noriega Editores, Colección Textos Politecnicos Serie Biotecnologica. México, pp 20-45. 2. Proctor, V. A, Cunningham, F.E. (1988) The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,* 26: 359-395.