



BALANCE HIDROFÓBICO/HIDROFÍLICO EN LA ESTRUCTURA EXTERNA DE LA β -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces lactis* : EFECTO EN LA ESTABILIDAD TÉRMICA

SOLIS, P. Josué¹, AGUILAR, U. Blanca¹ y COMBES, Didier². ¹Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. ²Gilbert Durand UMR-CNRS 5504, UMR-INRA 792, 31077 Toulouse, France. email: jsolis@ciatej.net.mx. Tel. (33)33 45 5200, dcombes@insa-tlse.fr.

Palabras claves: modificación química, desnaturalización, efecto protector

Introducción. La β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* es una enzima capaz de hidrolizar y catalizar la anomerización de α y β -lactosa. Algunos autores han ideado métodos que muestran una estabilidad contra la desnaturalización térmica de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (1 y 2). Nuestro objetivo principal es de someter a la β -galactosidasa a una modificación química en su superficie proteica y así de caracterizar su desnaturalización térmica para poder identificar su efecto protector. La modificación química practicada fue la modificación en el microambiente de la proteína, cambiando su carácter hidrofílico/hidrofóbico con dextrana y polietilén glicol (PEG) respectivamente.

Metodología. La β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) purificada de *Kluyveromyces lactis* se encuentra en forma de una preparación líquida, bajo el nombre de MAXILACT LX500. La enzima se modifica químicamente, con dextrana de 42 kDa, según la técnica de activación por CNBr (3). Igualmente la enzima es modificada con PEG según la técnica utilizada por Longo y Combes (4). En lo que respecta a la determinación de desnaturalización térmica y efecto protector, las soluciones de la enzima modificada fueron incubadas a temperaturas de 40°C y 45°C. La actividad de la enzima en cada lapso de tiempo fue determinada en porcentaje con respecto a la actividad inicial de la solución madre.

Resultados y discusión. En términos de modificación química con dextrana, solamente se realizó un grado de modificación de 0.8 mole de dextrana/mole enzima, mientras que la modificación con PEG₅₀₀₀ activado se realizaron 5 niveles. En la tabla 1 muestra la actividad enzimática residual obtenida después de cada una de la modificaciones en relación con su testigo.

Tabla 1. Constantes cinéticas

Modificación con dextrana de 42 kDa			
Relación de modificación (moles de dextrana o PEG/mole de enzima)	Km (mM)	Vmax (Umg ⁻¹ proteína)	Actividad residual (%)
Control	1.4	0.95	100
0.8	1.6	0.86	90
Modificación con PEG ₅₀₀₀			
Control	1.6	0.910	100
5	3.0	0.096	10.6
15	0.8	0.084	9.2
70	0.3	0.082	9.0
110	0.4	0.061	6.7

La modificación con PEG provoca una marcada disminución de la Km y la Vmax. Igualmente presenta casi una pérdida de actividad de la enzima. Por otro lado la modificación de la enzima con dextrana produce una

perdida de actividad del 10% aproximadamente. La figura 1, ilustra el efecto protector que produce cada una de las modificaciones en la superficie de la β -galactosidasa. En todas las modificaciones efectuadas a la enzima presenta un cierto efecto protector.

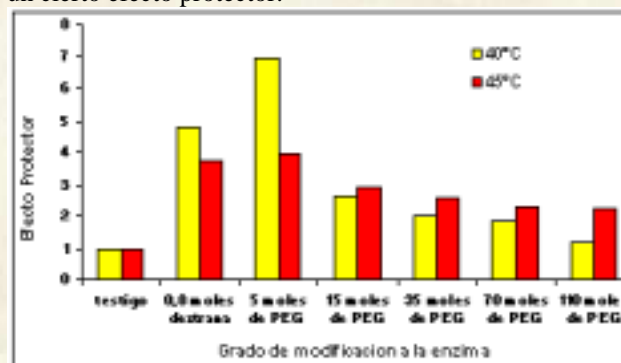


Figura 1. Efectos protectores provocados por la modificación química con dextrana y PEG₅₀₀₀.

Conclusión. Se ha observado que la modificación balance hidrofílico/hidrofóbico de la superficie de la β -galactosidasa juega un papel importante en sus propiedades, principalmente en lo que respecta a la estabilidad térmica, actividad enzimática, afinidad por el sustrato entre otras. Creemos que la protección térmica se debe a la modificación a la superficie de la enzima con dextrana refuerza aun mas sus zonas hidrofóbicas internas de la proteína; mientras que la fijación del PEG₅₀₀₀ provoca que la enzima se desdoble exponiendo zonas hidrofóbicas y del sitio activo la cual provoca cierta desactivación en la enzima.

Agradecimiento. Agradezco enormemente al CONACYT por el financiamiento de este trabajo.

Bibliografía.

- ATHES, V. and COMBES D. (1998). Influence of additives on high pressure stability of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* and invertasa from *Sacharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb. Technol. 22, 532-537.
- QUINN, Z. K., ZHOU, XIAO, D.C. (2001). Inmovilización de β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. J. Food Eng., 48, 69-74.
- LONGO and COMBES, (1995). Chemical and enzymatic glycosylation of enzyme. Modification de their properties. *Enz. Eng.* XII. Vol.75, march 31, 125-129.
- LONGO, M.A., and COMBES, D. (1997). Influence of surface hydrophilic/hydrophobic balance on enzyme properties. *J. Biotechnol.*, 58,21-32.