

CARACTERISACION DE LA DESNATURALISACION TERMICA Y MODIFICACION QUIMICA DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis*.

SOLIS,P.J , COMBES, D. Centro de Bioingénieria Gilbert Durand UMR-CNRS 5504,UMR-INRA 792, 31077 Toulouse, France. email:combes@insa-tlse.fr, jsolis@insa-tlse.fr. Tel: (33) 5 61 55 94 55, fax: (33) 5 61 55 94 02

Palabras clave: β galactosidase, estabilidad termica, microcalorimetria diferencial

Introducción. La β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* es una enzima capaz de hidrolisar y catalisar la anomerización de α y β -lactose (1).la β -galactosidasa es un enzima muy inestable a temperaturas poco elevadas (2). Nuestro objetivo principal es de caracterizar la estabilidad térmica de la β -galactosidase comercial sin glicerol, de esta forma modificar químicamente la superficie de la enzima con la fijación de glúcidos, verificando los parámetros cinéticos y denaturalización con la ayuda del método de microcalorimetría Diferencial (DSC).

Metodología. La β -galactosidase (EC 3.2.1.23) utilizada es una preparación líquida purificada comercializada con el nombre de MAXILACT LX500. Se eliminó el glicerol contenido en la enzima comercial (51.4%), utilizando un sistema de ultrafiltración. La modificación química de la enzima fue realizada, utilizando una solución de sacarosa activada según la metodología de activación con CNBr (2). La tasa de modificación con glúcidos a sido determinada gracias a la utilización de sacarosa radioactiva (C^{14}). Para la desnaturalización y la determinación del efecto protector de la enzima modificada y nativa, nosotros hemos metido a incubar las soluciones enzimáticas a diferentes temperaturas (40, 45 y 50°C), hasta obtener el tiempo medio de vida de la enzima. La determinación del efecto protector (EP) se define como la relación que hay entre el tiempo de vida media de la enzima modificada con respecto con él de la enzima nativa. Se utilizó el método de microcalorimetría diferencial (DSC) para caracterizar la desnaturalización de las enzimas modificadas y nativa.

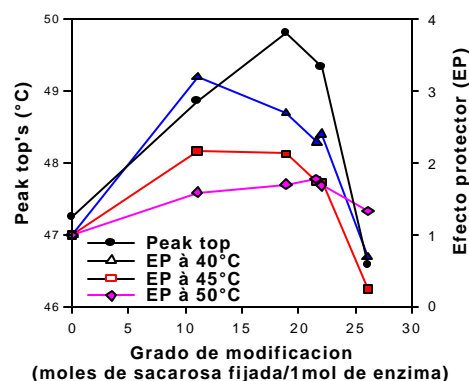
Resultados. En terminos de modificación química, hemos logrado hasta un grado de modificación de 26.1 moles sacarosa fijada/1 mol enzima.. El grado de modificación varia segun la concentración de la solución de sacarosa activada utilizada en cada caso (tabla I). El porcentaje de la actividad no presenta diferencia significativa entre 11 y 22 moles de sacarosa fijada/1 mol de enzima.

Tabla I. Grado de modificación química, desnaturalización y relación de la perdida de actividad.

Relación de moles sacarosa/1 mole enzyme	Grado de modificación Moles de sacarosa fija/1mol de enzima	Peak Top (°C)	Perdida de actividad (%)
nativa	0	47	100 %
500	11	49	97%
700	19	50	96%
900	21	48	96 %
1200	22	49	95 %

2000	26	47	57 %
------	----	----	------

Los termogramas obtenidos de las desnaturalizaciones en las enzimas modificadas por el DSC muestran un desplazamiento del pico de denaturalización (peak top) con respecto a la enzima nativa. En la figura 1 se ilustran los resultados del efecto protector de cada grado de modificación en la enzima a las diferentes temperaturas y la curva de los picos de desnaturalización arrojados por el DSC. Si comparamos el efecto protector de la enzima modificada a diferentes grados y los "peak top's" se



observa que existe una relación bien marcada entre ellos.

Figura 1. Relación entre los efectos protectores con los "peak top's" de desnaturalización en cada grado de modificación.

Conclusion. En lo que respecta a la actividad enzimática de las enzimas modificadas, no presenta ninguna diferencia significativa respecto a la enzima nativa. Por otro lado, la modificación de la enzima presenta una mejor estabilidad frente a la denaturalización térmica (EP= 3.2 a 40°C). La máxima modificación de la enzima (26 moles de sacarosa fijada/1 mol de enzima) no aumenta significativamente su talla (un 5% más de diferencia) con respecto a la enzima nativa.

Agradecimientos. Toda mi gratitud a CONACYT por su apoyo financiero, a Mme. Monique Suderie por su ayuda en el desarrollo de este trabajo.

Bibliografía.

- MBUYI-KALALA *et al*, (1990). Anomerization and hydrolyses of lactose by β -galactosidase from *Saccharomyces lactis*. Arch.Biochem.Biophys, Vol 277, 434-438.
- BEAR, R. J., and LOEWENSTEIN, M. (1979). Activity of β -D-galactosidase from *Saccharomyces*

**CARACTERISACION DE LA DESNATURALISACION TERMICA Y MODIFICACION QUIMICA DE *b*-
GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis*.**

SOLIS,P.J , COMBES, D. Centro de Bioingeniería Gilbert Durand UMR-CNRS 5504,UMR-INRA 792, 31077
Toulouse, France. email:combes@insa-tlse.fr, jsolis@insa-tlse.fr. Tel: (33) 5 61 55 94 55, fax: (33) 5 61 55 94 02

Palabras clave: *b*galactosidase, estabilidad termica, microcalorimetria diferencial

lactis at temperature below 0°C. J. Dairy Sci. 62. 1041-1044.

3. LONGO and COMBES, (1995). Chemical and enzymatic glycosylation of enzyme. Enz. Eng. XII. Vol.75, march 31, 125-129.