

---

# $\beta$ -GALACTOSIDASA FUNGICA INMOVILIZADA EN UN INTERCAMBIADOR ANIONICO: OBTENCION Y CARACTERIZACION DEL BIOCATALIZADOR

M. ZAMISCH y F. BATISTA-VIERA

Univ.de la República, Fac. de Química, Casilla de Correo 1157, Montevideo - Uruguay

---

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como principal objetivo la obtención y caracterización de un biocatalizador en fase sólida de aplicación en la hidrólisis de la lactosa de un efluente de la industria lechera. Con este propósito se optimizó la inmovilización de una preparación comercial de b-galactosidasa de *A. oryzae* (Biolactase <sup>®</sup>) por adsorción iónica en DEAE-Sepharose CL-6B. Cuando se incubó una solución de enzima con esta resina bajo las condiciones óptimas encontradas, se alcanzó un rendimiento de inmovilización del 99%. La actividad expresada por el derivado así obtenido fue del 40 - 66%, y los valores de  $K_M$  y  $V_{M\acute{a}x}$  aparentes del mismo para el sustrato artificial ONPG fueron de 19.7 mM y 79 mmol min<sup>-1</sup>Mg<sup>-1</sup>. El biocatalizador mantuvo el 100% de su actividad inicial durante dos meses de almacenamiento a 4°C y su actividad se redujo al 50% al cabo de 34 días a 25°C. En ensayos de hidrólisis de lactosa tamponada al 5% realizados con el derivado en columna durante tres días a 25°C, se alcanzaron grados de conversión del orden de 80%, manteniéndose el total de la actividad al cabo del proceso. Se concluye que tanto la relación lineal encontrada entre carga enzimática aplicada y actividad expresada, como la alta capacidad de la resina, permiten la obtención de derivados activos y estables de utilidad en procesos de lactólisis.

## FUNGAL $\beta$ -GALACTOSIDASE IMMOBILIZED ONTO AN ANION-EXCHANGE RESIN: OBTENTION AND CHARACTERIZATION OF THE BIOCATALYST

### ABSTRACT

A solid phase biocatalyst to be applied to lactose hydrolysis in a byproduct of a dairy industry has been obtained and characterized. For this, the immobilization of a commercial b-galactosidase from *A. oryzae* (Biolactase <sup>®</sup>) by ionic adsorption on DEAE-Sepharose CL-6B was optimized. When the enzyme solution was incubated with this resin under the optimized conditions, the immobilization yield achieved was 99%. The expressed activity for the obtained derivative was in the range of 40-66%, and its apparent  $K_M$  and  $V_{M\acute{a}x}$  values for the artificial substrate ONPG were 19.7 mM and 79 mmol min<sup>-1</sup>Mg<sup>-1</sup>. The biocatalyst maintained 100% of its initial activity during storage at 4°C for 2 months and its activity was reduced to 50% after 34 days at 25°C. When hydrolysis assays were performed on buffered lactose solutions (5%, w/v) using a column bio-reactor continuously fed for 3 days at 25°C, the conversion degree was of the order of 80%, and the activity was maintained during the whole process. In conclusion, both the lineal ratio found between applied enzyme and expressed activity, and the high loading capacity of the resin, allow the obtention of active and stable derivatives useful for lactose hydrolysis.

*Keywords:* fungal  $\beta$ -galactosidase, enzyme immobilization, anion-exchange carriers, lactose hydrolysis, whey permeate

## INTRODUCCION

Durante el proceso de elaboración de quesos, se producen grandes volúmenes de lactosueros, buena parte de los cuales son ultrafiltrados para recuperar las proteínas de alta calidad que contienen y originando así un permeato de lactosuero. Este producto secundario de la industria láctea que contiene fundamentalmente péptidos, lactosa, minerales y vitaminas es descartado en su mayor parte, siendo una importante causa de contaminación ambiental (Zadow, 1992). La industrialización tanto de lactosueros como de permeatos se ve facilitada mediante la hidrólisis de su lactosa constituyente (4.5 - 4.8%), superando así las dificultades derivadas de su baja solubilidad, bajo poder edulcorante y limitado rango fermentativo (Pomeranz, 1994).

La tecnología más sencilla en este proceso involucra a la enzima  $\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.23), comunmente denominada lactasa, la cual hidroliza la lactosa en sus componentes monosacáridos, glucosa y galactosa (Agrawal et al., 1989).

Sin embargo, las lactasas comerciales son económicamente poco accesibles dada la dificultad de su aislamiento e inestabilidad, como para justificar su uso en solución con sustratos como los permeatos y lactosueros en procesos de baja rentabilidad (Axelsson y Zacchi, 1990). Una tecnología enzimática económicamente viable en estos casos implica el uso de sistemas de bio-reactores con enzima inmovilizada, que posibiliten su reuso o el desarrollo de procesos continuos (Baret, 1979; Sprossler y Plainer, 1983). Entre los diversos tipos de métodos de inmovilización de enzimas disponibles, los métodos reversibles tienen la enorme ventaja de posibilitar el reuso del soporte. En busca de la obtención de biocatalizadores en base a  $\beta$ -galactosidasa en fase sólida para la industria láctea, hemos reportado recientemente la inmovilización covalente de  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* mediante uniones disulfuro (Ovsejevi et al., 1998). Otra alternativa en cuanto a la inmovilización reversible de una enzima es a través de procesos de adsorción simple, no covalente, que combinan la simplicidad con la facilidad de reuso del soporte. La naturaleza iónica de la interacción facilita la obtención del biocatalizador, no siendo necesarias activaciones previas del mismo ni modificaciones de la enzima a inmovilizar. Además, la posible recuperación de la matriz lo hace sumamente económico como método de inmovilización (Brena, 1996).

En este trabajo se ha optimizado la inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa ácida de *Aspergillus oryzae* en un intercambiador aniónico (DEAE Sepharose). Se ha caracterizado el biocatalizador obtenido, y estudiado su aplicación en procesos de hidrólisis de la lactosa de soluciones tamponadas y

permeatos de lactosuero.

## MATERIALES

DEAE-Sepharose CL-6B, o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) y lactosa fueron adquiridos de Sigma (Saint Louis, MO);  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (Biolactase®) fue donada por Quest, (USA). El reactivo de Bradford para la determinación de proteínas fue adquirido de Bio-Rad (Richmond, CA). El kit para la determinación de glucosa por método enzimático fue adquirido de Reactivos del Uruguay (Reacur). El permeato de lactosuero fue donación de la Cooperativa Nacional de Productores de Leche (CONAPROLE) de Uruguay. Otros productos químicos usados fueron de grado reactivo o analítico y adquiridos de Sigma y Fluka (Buchs, Suiza).

## METODOS

-Ensayo de actividad de  $\beta$ -galactosidasa soluble e inmovilizada: se incubó 50-100  $\mu$ l de solución de enzima (aprox. 0.12 mg/ml) o suspensión estándar del biocatalizador inmovilizado (0.1 g de derivado escurrido -filtrado en vacío- en 1 ml de tampón de inmovilización) con 3 ml de ONPG (45 mM) en tampón de actividad (50 mM acetato de sodio, pH 5.5, 2 mM  $MgCl_2$ ) con agitación magnética. La velocidad de formación del o-nitrofenol (ONP) fue seguida espectrofotométricamente a 405 nm durante 1 min. Se definió una *unidad de enzima (UE)* como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de ONP por minuto bajo las condiciones especificadas.

-Determinación de proteínas: se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976). La cantidad de proteína inmovilizada fue calculada como la diferencia entre la proteína aplicada y la obtenida en las fracciones de sobrenadante y lavados luego de la inmovilización.

-Inmovilización: se incubó DEAE-Sepharose equilibrado en tampón de inmovilización, con la solución de enzima en una relación 3-4 mg de proteína por gramo de gel escurrido, con agitación a temperatura ambiente durante 30 min - 2 hs en tampón de inmovilización (50 mM acetato de sodio, pH 5.0 o 5.5, suplementado o no con 2 mM  $MgCl_2$ ). El biocatalizador insoluble obtenido fue lavado con el mismo tampón, y se midió actividad y concentración proteica en las fracciones de sobrenadante y lavados. Se midió la actividad expresada de una suspensión estándar del derivado.

Se calculó el rendimiento de inmovilización (1) y el porcentaje de actividad expresada (2) como:

$$RI (\%) = \frac{\text{prot. aplic.} - (\text{prot. sobren} + \text{lav.})}{\text{prot. aplicada}} \cdot 100 \quad (1)$$

$$AE (\%) = \frac{UE \text{ expresadas}}{UE \text{ aplicadas}} \cdot 100 \quad (2)$$

-Cinética de inmovilización: se realizó el ensayo de inmovilización como fue descrito previamente pero variando el tiempo de incubación: 30, 60, 90, y 120 minutos, y se determinaron RI (%) y AE (%) según (1) y (2).

-Incidencia de la carga enzimática aplicada: el rango de carga enzimática ensayado fue variado entre 114 y 915 unidades de enzima por gramo de gel escurrido. Cada inmovilización fue realizada en las condiciones descritas anteriormente; se lavaron los derivados obtenidos y se determinaron RI (%) y AE (%) a cada uno.

-Elución de la enzima del derivado por aumento de la fuerza iónica: se incubó el biocatalizador inmovilizado (0.5 g de gel escurrido conteniendo 233 UE) en presencia de concentraciones de NaCl entre 0.05 - 1.0 M durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Luego de la incubación, se midió actividad en el sobrenadante. Se calculó el porcentaje de actividad recuperada como:

$$\% \text{ Act. recuperada} = \frac{\text{UE sobrenadante}}{\text{UE aplicadas}} \cdot 100 \quad (3)$$

-Hidrólisis de lactosa en columna y en batch: se realizaron a temperatura ambiente, utilizando lactosa al 5% en tampón de actividad y permeato de lactosuero tratado (hervido durante 10 min, filtrado y ajustado a pH 5.5). Para la reacción en batch se incubaron 0.4 g de derivado escurrido (50 UE) con 10 ml de sustrato, tomándose alícuotas a distintos tiempos, las cuales fueron filtradas y hervidas durante 5 minutos. Para la reacción en columna, se utilizó un biorreactor con las siguientes dimensiones: 1.5 cm de diámetro interno y 4.5 cm de altura. Se aplicó el sustrato en forma continua a velocidades de 10 ml/h (permeato) y 20 ml/h o 40 ml/h (lactosa tamponada 5%) a una columna conteniendo 337 UE/g de derivado. El avance de la reacción de hidrólisis de lactosa se siguió mediante determinación por método enzimático de la glucosa formada. Se controló la liberación de enzima activa del soporte durante las primeras etapas de la hidrólisis incubando alícuotas sin hervir.

-Regeneración de la resina: se realizó la regeneración de 67 g de derivado que habían sido utilizados en la hidrólisis de lactosa y habían perdido parte de su actividad. El derivado fue lavado abundantemente con tampón 10 mM acetato de sodio, pH 5.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 M NaCl y posteriormente con tampón 10 mM acetato de sodio, pH 5.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, sin sales. Por último se equilibró la matriz libre de enzima con tampón 50 mM acetato de sodio, pH 5.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Se realizó la inmovilización de enzima nueva en las condiciones descritas anteriormente.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Selección del tampón de inmovilización

Dado que el punto isoeléctrico de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* se encuentra alrededor de 4.6, se realizó un estudio de su inmovilización a pH 5.0 y 5.5 en DEAE-Sepharose CL-6B. Como se observa en la tabla 1, se obtuvo un mayor porcentaje de inmovilización (99%) y de actividad expresada (60-66%) cuando la inmovilización fue realizada en el tampón 50 mM acetato de sodio, pH 5.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Las diferencias en los porcentajes de inmovilización podrían deberse a que a pH 5.0, la enzima se encuentra más cerca de su punto isoeléctrico, por lo que a este pH la densidad de cargas es menor que a pH 5.5, y consecuentemente la unión al intercambiador es más débil. Con respecto a la actividad expresada, se observa un aumento notorio de la misma para el biocatalizador inmovilizado en presencia de Mg<sup>2+</sup>. Una posible explicación sería que el magnesio estabiliza una conformación de la enzima y/o protege grupos cargados negativamente comprometidos en el sitio activo de la enzima o próximos al mismo, permitiendo así que ésta interactúe con el soporte en una conformación más activa. Otro punto a destacar es que si bien la inmovilización proteica es del orden del 100%, se expresa alrededor de un 60%, lo que indica que un 40% de la enzima inmovilizada se encuentra inactiva.

### Incidencia de la carga enzimática aplicada

En todo proceso de inmovilización, es importante evaluar la incidencia que tienen la cantidad de proteína y actividad aplicadas sobre: el rendimiento de dicho proceso, la actividad expresada por los derivados obtenidos, y la capacidad del soporte. En los ensayos realizados, el porcentaje de inmovilización proteica fue del 100%. Además, al variar la carga enzimática aplicada entre 114 y 915 UE por gramo de soporte escurrido, no se observó influencia alguna sobre el porcentaje de actividad expresada (tabla 2). De hecho, se encontró una relación lineal entre la actividad expresada por el derivado y la carga enzimática aplicada. Esto sugiere que no existen fuertes efectos difusionales o de transferencia de

Tabla 1: Influencia del tampón en la inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa en DEAE-Sepharose CL-6B.

Tampón de inmovilización	Rendimiento de inmovilización (%)	Actividad Expresada (%)
50 mM Acetato de sodio, pH 5.0	92	43
50 mM Acetato de sodio, pH 5.5	99	50
50 mM Acetato de sodio, pH 5.5 2 mM MgCl <sub>2</sub>	99	60-66

masa en la enzima inmovilizada.

El soporte no fue saturado con ninguna de las cargas enzimáticas ensayadas, lo que demuestra la gran capacidad del intercambiador que permite la inmovilización de grandes cantidades de enzima.

Es importante observar que existe una gran variación en la actividad expresada por los derivados obtenidos en distintos ensayos (tabla 1 y tabla 2). En todos los casos, se evidencia una cierta inactivación de la enzima al ser inmovilizada, ya que se expresa un menor porcentaje de actividad con respecto a la aplicada, la cual no se recupera en el sobrenadante.

#### Cinética de inmovilización

El proceso de inmovilización se completa a los 30 minutos de incubación, lo cual es de esperar en base a que la interacción entre la enzima y el soporte es de tipo iónica. Esto es una ventaja frente a otros tipos de inmovilización utilizados, como por ejemplo inmovilizaciones covalentes, los que requieren mucho tiempo de interacción entre la enzima y el soporte para alcanzar rendimientos aceptables (Ovsejevi et al., 1998).

#### Determinación de parámetros cinéticos

Se realizó con ONPG bajo condiciones de velocidad inicial. Los valores de  $K_m$  y  $V_{m\max}$  aparentes determinados para el biocatalizador inmovilizado, procesado por método directo y método de Lineweaver-Burk, fueron de 19.7 mM y 79  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  respectivamente, mientras que para la enzima en solución fueron de 10.5 mM y 183  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . La diferencia en el valor del  $K_m$  observado podría ser debido a una dificultad de acceso del sustrato al sitio activo de la enzima inmovilizada. Sin embargo, como se observó previamente en la tabla 2, los efectos difusionales no parecen ser un problema mayor en este sistema. Es más plausible pensar que al ser inmovilizada la enzima, ocurre un cambio conformacional a nivel del dominio del sitio activo, lo cual causa una menor afinidad por el sustrato, aumentando así el  $K_m$ .

#### Elución de la enzima del biocatalizador

La  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada comenzó a eluirse del intercambiador a una concentración de NaCl de 0.5 M aproximadamente. Además se observó

Tabla 2: Incidencia de la carga enzimática aplicada en la inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa en DEAE-Sepharose CL-6B.

Carga aplicada (UE/g)	UE/g expresadas	% Actividad expresada
915	395	43
457	194	43
229	93	39
114	53	47

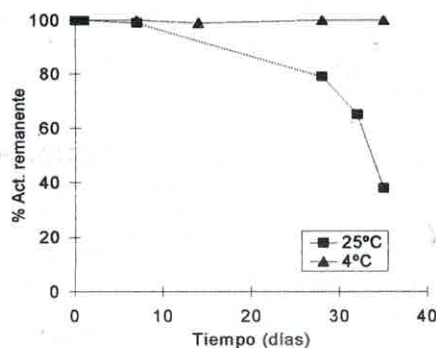


Fig. 1: Estabilidad de almacenamiento del derivado enzimático a 4°C y 25°C.

una reactivación de la enzima eluida, recuperándose un 87% de la actividad inicial cuando el biocatalizador insoluble fue incubado con NaCl 1.0 M. Esto concuerda con los resultados de la inmovilización, que muestran una inactivación parcial de la enzima al ser inmovilizada.

Se realizó un control de enzima en solución, incubando en presencia de las distintas concentraciones de NaCl y confirmándose su estabilidad en dichas condiciones.

#### Estabilidad del derivado enzimático

Se estudió la estabilidad de almacenamiento a una suspensión estándar de derivado conteniendo 0.45 mg de proteína inmovilizada por ml de suspensión. El derivado mantuvo el 100% de su actividad inicial durante 53 días a 4°C. Su  $t_{1/2}$  fue calculado en 34 días a 25°C (figura 1). Este hecho es concordante con la gran estabilidad térmica que presenta la enzima en solución, debido a que la misma es de origen extracelular (Park et al., 1979).

#### Ensayos de hidrólisis de lactosa

El hecho de que la lactasa de *A. oryzae* tenga un pH óptimo de aproximadamente 5.0 (Park et al., 1979), permite su uso efectivo en la hidrólisis de la lactosa componente del suero ácido. Con tal objetivo se estudió la actividad del biocatalizador insoluble obtenido sobre su sustrato natural, la lactosa, en solución tamponada al 5% y en permeato de lactosuero tratado y ajustado a pH 5.5. En la figura 2 se observa el perfil de la reacción de hidrólisis en batch durante las tres primeras horas, período al cabo del cual se alcanza un máximo porcentaje de conversión. Cuando el sustrato fue lactosa tamponada, se obtuvieron porcentajes de conversión aparentes menores (57%) que cuando fue permeato tratado (71%).

En controles de liberación de la enzima del soporte, estos fueron negativos para el primer caso y positivos para el segundo. De acuerdo a

estos resultados, el mayor porcentaje de hidrólisis obtenido para el caso del permeato se podría explicar como una sumatoria de la actividad del derivado y la actividad de enzima soluble liberada del soporte.

Cuando se ensayaron procesos de hidrólisis de la lactosa (lactolisis) de soluciones al 5% en tampón de actividad (20 ml/h y 40 ml/h) y de permeato de lactosuero (10 ml/h) en mini-reactores de lecho fijo (columnas conteniendo 4 g de derivado enzimático con 1349 UE), se alcanzaron grados de conversión del orden de 80% y 92% respectivamente (figura 3). Sin embargo hubo una pronunciada caída de actividad del derivado enzimático alimentado con permeato, a diferencia de aquel alimentado con lactosa tamponada para el cual el porcentaje de conversión se mantuvo en ese orden hasta las 71 hs. Ambos biocatalizadores insolubles fueron lavados luego de su uso, y se midió su actividad  $\beta$ -galactosidasa remanente (con ONPG), siendo la misma de 43% y 100% respectivamente. Estos resultados indican la presencia de componentes del permeato, probablemente sales, que compiten con la enzima por los grupos activos del intercambiador, provocando su elución del soporte. También se puede observar claramente que al aumentar la velocidad de flujo del sustrato, disminuyen los porcentajes de conversión (a 20 ml/h el porcentaje máximo es de 81% mientras que a 40 ml/h es de 72% para la lactosa tamponada 5%). Este efecto es consecuencia del menor tiempo de residencia del sustrato en el mini-reactor a mayores flujos.

Si se comparan los porcentajes de conversión aparentes obtenidos para la hidrólisis de lactosa realizada en batch (57% y 70% para lactosa tamponada y permeato respectivamente) con respecto a la hidrólisis realizada en columna, se puede observar que los porcentajes obtenidos para los ensayos realizados en columna fueron marcadamente superiores. Este comportamiento es consecuencia del hecho que la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* es inhibida competitivamente por uno

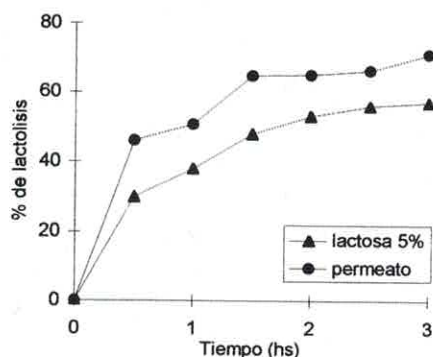


Fig. 2: Hidrólisis en batch de lactosa tamponada 5% y permeato de lactosuero tratado (pH 5.5).

de los productos de reacción, la galactosa. Los resultados obtenidos reflejan dicha inhibición cuando la reacción ocurre en batch, la cual es superada como es de esperar cuando el proceso se realiza en columna.

#### Regeneración del biocatalizador insoluble agotado

Se regeneró la matriz de un derivado que había sido utilizado en la hidrólisis de lactosa, y que había perdido un gran porcentaje de su actividad  $\beta$ -galactosidasa con respecto a la inicial. Se volvió a inmovilizar enzima nueva en la matriz regenerada, obteniéndose un rendimiento de inmovilización (96%) y una actividad expresada (54%) del orden que se venía alcanzando. Esto confirma la posibilidad de regenerar el biocatalizador en fase sólida una vez que éste ha perdido su actividad.

#### CONCLUSIONES

Las condiciones seleccionadas como óptimas para la inmovilización fueron: tampón 50 mM acetato de sodio, pH 5.5, 2 mM  $MgCl_2$ , con un tiempo de incubación en un rango de 30 minutos a 2 hs. La carga enzimática seleccionada depende del tipo de biocatalizador insoluble que se desee obtener: si se quiere obtener un derivado muy activo y de vida media larga, la carga enzimática aplicada debe ser relativamente alta, considerando que existe un compromiso entre la carga aplicada y la actividad expresada del biocatalizador. En estas condiciones se obtuvieron derivados muy activos y estables. Los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  aparentes determinados con ONPG fueron de 19.7 mM y 79  $\mu\text{mol ONP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ .

En los ensayos de hidrólisis de lactosa tamponada al 5% en batch y en columna, el derivado fue más eficiente cuando fue utilizado en columna, condiciones en las cuales se sobrelleva la inhibición por producto observada en batch. Los controles de elución de enzima activa y la determinación de actividad remanente del bioca-

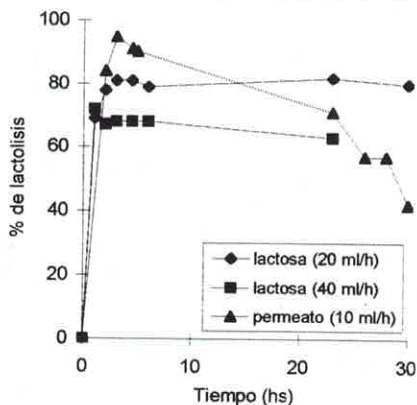


Fig. 3: Lactolisis en columna de: a) lactosa 5% en tampón de actividad (pH 5.5); b) permeato de lactosuero tratado y ajustado a pH 5.5.

talizador luego de su uso confirmaron que la enzima no se eluye ni se inactiva durante dichos procesos.

Cuando se estudió la hidrólisis de lactosa en permeato, se obtuvieron porcentajes de bioconversión mayores que para el caso de la lactosa tamponada tanto en columna como en batch. Sin embargo se observó una marcada disminución en el grado de bioconversión. Los porcentajes de actividad remanente (43%), y los controles de elución de enzima activa (positivos) indican como posible mecanismo de la disminución de la actividad, la liberación de enzima activa resultante del efecto eluyente de las sales del permeato.

Como solución a dicho problema se estudia actualmente el entrecruzamiento del biocatalizador con un agente bifuncional luego de la inmovilización, con resultados muy promisorios. Otra solución a dicho problema es la desionización o el agregado de agentes acomplejantes al permeato previo al uso del biocatalizador insoluble en la hidrólisis del mismo.

#### AGRADECIMIENTOS

Esta investigación es financiada por el Programa CONICYT-BID (Proyecto Tecnológico 92/065) y el IPICS, Universidad de Uppsala, Suecia.

#### REFERENCIAS

Agrawal, S., S.K. Garg y S.M. Dutta, Microbial  $\beta$ -galactosidase production, properties and industrial applications, *Indian J. Dairy Sci.*: 42 (2), 251-262 (1989).

Axelsson, A., y G. Zacchi, Economic evaluation of

the hydrolysis of lactose using immobilized  $\beta$ -galactosidase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*: 24/25, 679-693 (1990).

Baret, J.L., Large-scale Production and Application of Immobilized Lactase, *Methods in Enzymology*: 136, 411-423 (1979).

Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*: 72, 248 (1976)

Brena, B. M., Reversible Immobilization of Enzymes Using Agarose-bound Group-specific Ligands. *Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala* (1996).

Ovsejevi, K., V. Grazú y F. Batista-Viera, Hidrólisis de lactosa en productos lácteos catalizada por  $\beta$ -galactosidasa reversiblemente inmovilizada en tiosulfonato-agarosa, *Información Tecnológica*: 9, 65-69 (1998).

Park, Y.K., M.S.S. De Santi y G.M. Pastore, Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *Journal of Food Science*: 44 (1), 100-103 (1979).

Pomeranz, Y., Lactase ( $\beta$ -D-galactosidase). Possibilities in the Food Industries II, *Food Technology*: 690, 96-101 (1994).

Sprossler, B. y H. Plainer, Immobilizing lactase for processing whey, *Food Technology*: 93-95 (1983).

Zadow, J.G., *Whey and lactose processing*. Elsevier Applied Science, Londres y Nueva York (1992).