



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Diseño y Desarrollo de Prácticas Para Implementarse en el Programa de Enzimología Aplicada a los Alimentos

TESIS

Que para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTAN

Adela Blanco Paredes
Ana María Fernández Ramírez

México, D. F.

M-21640

1980



DEPTO. DE PASANTES Y
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

M-21640



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Diseño y Desarrollo de Prácticas
Para Implementarse en el Programa de
Enzimología Aplicada a los Alimentos**

TESIS

Que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTAN

Adela Blanco Paredes

Ana María Fernández Ramírez

México, D. F.

1980



DEPTO. DE PASANTES Y
COMUNES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

P R E S I D E N T E : ENRIQUE GARCÍA GALIANO
V O C A L : EMILIO BARRAGÁN HERNÁNDEZ
S E C R E T A R I O : RAUL AGUILAR CABALLERO
1er S U P L E N T E : ANA LAURA FLORES LECHUGA
2do S U P L E N T E : ADOLFO GALNARES CAMPOS

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS

LABORATORIO 202

FACULTAD DE QUÍMICA

U N A M

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DE LAS SUSTENTANTES


ADELA BLANCO PAREDES


ANA MARÍA FERNÁNDEZ RAMÍREZ

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA


EMILIO BARRAGÁN HERNÁNDEZ

A nuestros padres.

INSTRUIR PUEDE CUALQUIERA
EDUCAR,
SOLO EL QUE SEA UN EVANGELIO PURO

J. DE LA LUZ Y CABALLERO

I N D I C E

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	7
II.	GENERALIDADES	10
1.	Algunos datos cronológicos de la Enzimología.	12
2.	Cambios que ha presentado el Programa de Prácticas de Enzimología Aplicada a los Alimentos.	16
3.	Colocación de la Materia en el Plan de Estudios.	20
4.	Aspectos didácticos considerados en el Diseño y Desarrollo de las Prácticas de Enzimología Aplicada a los Alimentos:	24
1.	Planeación.	25
2.	Organización.	25
3.	Ejecución.	30
4.	Evaluación.	31
5.	Información general.	32
A.	Sustratos importantes sobre los que actúan algunas enzimas empleadas en la Industria Alimentaria.	32
B.	Aspectos principales de algunas enzimas usadas en la Industria Alimentaria.	36

	C.	Principales microorganismos usados en la obtención de enzimas aplicables a la Industria Alimentaria.	41
	D.	Usos generales de las enzimas	44
III.		MATERIAL	48
	A.	Enzimas.	50
	B.	Substratos	53
	C.	Microorganismos.	54
	D.	Material y Equipo.	55
	E.	Substancias.	56
IV.		DISEÑO Y DESARROLLO DE PRACTICAS.	57
	A.	Presentación de las Prácticas.	59
	B.	Desarrollo de las Prácticas.	60
		1. Identificación de Enzimas	60
		2. Determinación de Actividad Enzimática	75
		3. Activación e Inhibición Enzimática	103
		4. Pruebas de Precipitación Enzimática.	110
		5. Estabilización y Purificación de Enzimas.	123
		6. Obtención de Enzimas por Inducción Microbiana.	140
		7. Aplicación de Enzimas a los Alimentos.	157

1.	Aplicación a los Alimentos de Enzimas Comerciales e Inducidas en el Labora- torio.	171
2.	Inhibición de Enzimas Presentes en los Alimentos.	174
3.	Activación de Enzimas Presentes en los Alimentos.	175
4.	Medición del Contenido Enzimático como Índice de un Proceso.	177
V.	DISCUSIÓN	180
VI.	CONCLUSIONES	185
VII.	BIBLIOGRAFÍA.	189

I N T R O D U C C I Ó N

INTRODUCCIÓN

La Ciencia evoluciona paralela al desarrollo histórico de la humanidad. El hombre crea las bases de la Química y aplica sus conocimientos a los alimentos, donde la Enzimología juega un papel preponderante tanto en la investigación pura como en la aplicada.

La Enzimología estudia el comportamiento de las enzimas, biocatalizadores indispensables para que se realicen las funciones metabólicas. (51,91).

Varias materias fundamentan el estudio de la Enzimología: la Bioquímica abarca rutas metabólicas, estructura química y cinética enzimática; la Fisicoquímica estudia orden, velocidad, dirección y equilibrio de reacciones; la Microbiología analiza conservación, manejo de microorganismos y sus enzimas; la Ingeniería Química aporta los diagramas de flujo y la Nutrición comprende los procesos de digestión de los alimentos por medios enzimáticos. (6,51,57,81).

Las enzimas se aplican en diferentes industrias, destacando en la Industria Farmacéutica su uso como auxiliares digestivos; en Curtiduría, su empleo en el proceso de maceración de las pieles; en la Industria Textil, para eliminar el apresto de las telas; en la Industria Alimentaria, en Confitería, la utilización de invertasa en centros suaves de

bombones; la pectinasa, para extraer, clarificar y filtrar jugos de frutas y vegetales; en Productos Lácteos, el empleo de renina en la elaboración de quesos, entre otros usos. (43, 78,87,90,91).

Es importante profundizar en el estudio de la Enzimología para fomentar el establecimiento de industrias nacionales que se dediquen a obtener enzimas de manera que se cubra la demanda nacional y se evite la importación de las mismas.

El Tecnólogo de Alimentos desarrolla, controla y actualiza las tecnologías existentes en la Industria Alimentaria, considerando factores nutritivos, fisicoquímicos, organolépticos, económicos y otros, logrando así productos de buena calidad y aceptación en el mercado de consumo.

El objetivo de éste trabajo es el de diseñar prác-ticas que podrían implementarse en el Programa de Enzimología Aplicada a los Alimentos, tomando en cuenta aspectos di-dácticos, académicos y tecnológicos, haciendo inferir al alumno, por medio de su razonamiento, los pasos a seguir frente a un problema, empleando conocimientos teóricos, técnicas de laboratorio y referencias bibliográficas.

G E N E R A L I D A D E S

11. GENERALIDADES

1. Algunos datos cronológicos de la Enzimología..	12
2. Cambios que ha presentado el Programa de Prácticas de Enzimología Aplicada a los Alimentos..	16
3. Colocación de la Materia en el Plan de Estudios..	20
4. Aspectos didácticos considerados en el Diseño y Desarrollo de las Prácticas de Enzimología Aplicada a los Alimentos..	24
1. Planeación..	25
2. Organización..	25
3. Ejecución..	30
4. Evaluación..	31
5. Información general..	32
A. Sustratos importantes sobre los que actúan algunas enzimas empleadas en la Industria Alimentaria..	32
B. Aspectos principales de algunas enzimas usadas en la Industria Alimentaria..	36
C. Principales microorganismos usados en la obtención de enzimas aplicables a la Industria Alimentaria..	41
D. Usos generales de las enzimas..	44

II. GENERALIDADES

1. ALGUNOS DATOS CRONOLÓGICOS DE LA ENZIMOLOGÍA

Es conveniente contemplar en forma breve, la evolución que ha presentado el conocimiento de los procesos enzimáticos hasta nuestros días.

John R. Whitaker (91), reporta:

<u>Siglo XVII</u>	Van Helmont consideró que el proceso de digestión era debido a cambios químicos.
<u>Siglo XVIII</u> <u>1752</u>	Reaumur demostró lo anterior haciendo tragar a halcones, bolsas perforadas que contenían carne. Esta, al ser vomitada se encontraba parcialmente hidrolizada.
<u>Siglo XIX</u> <u>1ra mitad</u>	Surgen dos puntos de vista: Liebig y sus <u>FERMENTOS DESORGANIZADOS</u> ; Pasteur y sus <u>FERMENTOS ORGANIZADOS</u> .
<u>1833</u>	Payen y Persoz encontraron en la malta una substancia termolábil que convertía al almidón en azúcar. Se le denominó <u>DIASTASA</u> . También <u>FERMENTO</u> .
<u>2da mitad</u>	Se descubren: pepsina, peroxidasa, polifenoloxidasas (Schoenbein 1856), invertasa (Berthelot 1860).
<u>1855</u>	Schoenbein descubrió la enzima vegetal peroxidasa.
<u>1878</u>	Kühne propuso el nombre <u>ENZIMA</u> (en la levadura).

1894 Fisher: ANALOGÍA DE LA LLAVE Y LA CERRADURA que explica la interacción enzima-sustrato.

1897 Buchner produce una fermentación con un extracto de levaduras libre de células.

Siglo XX

1902 Henri y Brown sugieren el intermedio enzima-sustrato.

1909 Sørensen investiga el efecto del pH en la actividad enzimática.

1913 Michaelis y Menten dan a conocer su expresión matemática sobre Cinética Enzimática.

1922-1928 Willstätter realiza las primeras purificaciones de enzimas, concluye erróneamente que no eran proteínas.

1926 Sumner realiza la primera cristalización de la ureasa. Mucho tiempo después se reconoció que éste hecho destruyó la teoría de Willstätter antes mencionada.

1929 Sumner recibe el Premio Nóbel por esta contribución.

1930-1940 Gran actividad en la cristalización de enzimas, principalmente en el Instituto Rockefeller (Northrop, Kunitz, Herrlott y Anson).

1955 Sanger reportó la secuencia completa de la estructura primaria de la insulina.

1959 Koshland publica su AJUSTE INDUCIDO ENZIMA-SUBSTRATO que explica la flexibilidad del sitio activo.

1964 Crastein y Davis desarrollan geles para separar electroforéticamente enzimas complementando la labor de Peter-son y Sober (1956) sobre celulosa de intercambio iónico.

- 1967 Kartha Bello y Harken determinaron la estructura tridimensional de ribonucleasa. Se comprende así la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las enzimas.
- 1968 Koshland elucida mecanismos enzimáticos
- 1969 Se reportó la síntesis completa de ribonucleasa por dos grupos de investigadores. Valles y Riordan investigan químicamente grupos específicos de enzimas complementando los trabajos de Koshland.
- 1972 Más de 100 enzimas han sido obtenidas en forma cristalina.

Wingard Jr. y Lemuel B. (52) reportan:

- 1971 1ra Conferencia de la Engineering Foundation International. Se dan las bases de la Ingeniería Enzimática.
- 1971-1973 Se realizan 10 simposios. Se efectúan 603 investigaciones con enzimas inmovilizadas.
- 1973 2da Conferencia de la Engineering Foundation International. Se tratan temas de estudios con lechos fluidizados inmunoproteínas inmovilizadas, inmovilización en las paredes celulares de los tejidos animales y en membranas, oxidasas inmovilizadas de función mixta, inmovilización de factores de la coagulación y la fibrinólisis, degradación de virus mediante enzimas inmovilizadas, enzimas en medio acuoso y síntesis de carbohidratos con enzimas inmovilizadas.
- 1975 3ra Conferencia de la Engineering Foundation International.

Natisk y Newton (66) informan los siguientes datos:

- 1975 Symposium on Enzymatic Conversion of Cellulosic Materials, Massachusetts.
- Gaden, Elmer L. (30) reporta:
1976 Symposium of Enzymatic Conversion of Cellulosic Materials.

(*)

Boyer, H.W., Chang, A.C., Cohen, S.N. y Helleny, R.S.:

1974

Chang y Cohen demostraron la traslación sucesiva de un gen Gram positivo a uno Gram negativo, en la codificación genética de una beta lactamasa de *Estafilo* *cocos aureus* que fué expresada completamente y mantenida indefinidamente en un plásmido de *E. coli*.

1974-1975

1976

Lovett y Branucci, Lovett y colaboradores, abrieron el camino para la clonación del DNA exterior de *B. subtilis* para *E. coli*.

1975

Cameron y colaboradores obtuvieron un híbrido bacteriófago lambda el cual fue insertado a un gen mutante de *E. coli* codificando para DNAligasa el cual da la pauta para doblar 5 veces mas la producción de ligasa.

1977

Panasenko y colaboradores modificaron la recombinación de la molécula lambda de DNA para producir un vector el cual bajo las condiciones adecuadas genera una cantidad de DNAligasa que es 500 veces mas grande que la producida por un cultivo puro, y suficiente para dar un aumento de alrededor de un 5% de la proteína total celular de *E. coli*.

1977

Duncan y colaboradores reportaron que un gen de *B. subtilis* (THY P3), el cual codifica para timidilasa sintetasa la cual funciona en *E. coli* y *B. subtilis* y transforma la timina auxótrofa a timina protótrofa.

1978-1980

Hasta la actualidad la Enzimología ha tenido un gran desarrollo en sus diferentes campos. Se han realizado simposios y conferencias anuales sobre inmovilización de enzimas biogenéticas, clonación, etc. llegándose a automatizar el análisis de enzimas por medio de computadoras.

(*) Boyer, H.W., Chang, A.C., Cohen, S.N., Helleny, R.S. PRODUCTS

NATURE. Academic Science, 32: 254-263 (1973)

2. CAMBIOS QUE HA PRESENTADO EL PROGRAMA DE PRÁCTICAS DE ENZIMOLOGÍA APLICADA A LOS ALIMENTOS.

La carrera de Químico Farmacéutico Biólogo surgió ante la necesidad de crear profesionales con un conocimiento amplio de la naturaleza, procesos químicos de los seres vivos y que además aplicaran éste, a la preparación industrial de medicamentos y cosméticos. Al requerirse una mayor especialización en la industria, la Facultad de Química reestructura ésta carrera y en 1971 la subdivide en tres orientaciones: Farmacia, Tecnología de Alimentos y Bioquímico Microbiólogo. (88).

El curso de Enzimología Aplicada a los Alimentos fué impartido desde el inicio de la orientación a Tecnología de Alimentos y su programa de laboratorio ha tenido las siguientes variaciones:

En 1971 la materia se enseñaba con un enfoque Bioquímico.

En 1972 el laboratorio constó de cuatro prácticas, en las cuales se trabajó con una enzima de tipo comercial que se aplicó a un alimento. Al finalizar cada práctica se entregó un reporte del trabajo realizado.

En 1973 se realizaban análisis cualitativos de cinética enzimática en enzimas comerciales (amilasa, proteasa, e invertasa), que comprendían mediciones de pH, temperatura y concentración enzima-substrato. Durante el curso práctico se realizaban tres exámenes y se debía presentar un informe bibliográfico y un reporte de los resultados obtenidos.

En 1974 y 1975 se intentó obtener en el laboratorio, enzimas de origen vegetal (papaína y bromelina) y de origen animal (pepsina y renina). Se realizaba una recopilación de datos bibliográficos sobre diferentes sistemas de obtención de enzimas y sus características.

Al no existir las condiciones necesarias para su extracción (equipo, sistemas térmicos adecuados, etc), la obtención de enzimas de origen vegetal y animal se dificultó; de éste modo, se trabajó con enzimas comerciales efectuando análisis cualitativos y cuantitativos. Los alumnos entregaron un reporte incluyendo datos generales de la enzima analizada, así como los resultados obtenidos en las prácticas efectuadas.

En 1976 se introduce en el laboratorio el estudio de las enzimas microbianas por considerarse que permitían un

alto grado de control y eficiencia en su actividad, el cual era difícil de obtener con las enzimas de origen vegetal y animal. Al utilizar enzimas microbianas se lograba un mejor aprovechamiento del tiempo asignado al semestre de prácticas, mientras que en las enzimas de origen animal y vegetal se dependía de tiempos de cosecha, aparatos de refrigeración para las vísceras y transporte al laboratorio de la materia prima para extraerlas, entre otros factores, lo que aumentaba el tiempo dedicado a cada práctica.

El método seguido en el laboratorio en ese año fue crear una práctica integral que duraba todo el semestre, siendo necesario recurrir al sistema de laboratorio abierto. Para el desarrollo de esta práctica se partía de una cepa, se diseñaba un medio de cultivo en el que crecía el microorganismo y posteriormente se realizaban pruebas con diferentes substratos para determinar la enzima que se producía en mayor cantidad. Una vez seleccionada, se hacían inducciones sucesivas para desarrollar la enzima escogida. Al finalizar la inducción, se determinaba la actividad enzimática y se procedía a precipitar la enzima, la cual se aplicaba posteriormente a un alimento.

De 1977 al 2do. semestre de 1979, se siguió el mismo método, mejorando el sistema de laboratorio al tratar con

mayor profundidad temas como los de inducción, pruebas de actividad enzimática, etc. El sistema de evaluación fue similar al de años anteriores y consistía en uno o dos exámenes durante el semestre y entrega de reportes de los datos obtenidos durante el mismo.

La materia de Enzimología Aplicada a los Alimentos ha avanzado tratando de cubrir las necesidades en cada semestre y mostrando los avances de esta ciencia.

3. COLOCACIÓN DE LA MATERIA EN EL PLAN DE ESTUDIOS

Para cursar la materia de Enzimología Aplicada a los Alimentos, el alumno necesita conocimientos previos de Bioquímica, Microbiología General y Fisiología Farmacéutica.

Uno de los temas comprendidos en el programa de Bioquímica es el estudio de las enzimas, abarcando conocimientos sobre la naturaleza, propiedades, características, clasificación y utilización de las enzimas, coenzimas y cofactores que intervienen en su funcionamiento.

El curso de Microbiología General es importante ya que en él se estudian, entre otros temas, la nutrición, fuentes de energía, elementos y compuestos principales para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos.

En el laboratorio de Microbiología General, se realizan prácticas de observación micro y macroscópica de las colonias, coloraciones simples y tinción de gram, preparación de medios de cultivo, sistemas de siembra y conservación de cepas, obtención de cultivos puros, esterilización, efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano, acción de enzimas microbianas sobre diferentes substratos, etc. Estos

conocimientos son de gran aplicación en el laboratorio de Enzimología ya que una parte del programa de prácticas se realiza con un microorganismo que se induce a producir una enzima determinada.

La materia de Fisicoquímica Farmacéutica es, actualmente, la única seriada con Enzimología. En ella se estudian los principios fisicoquímicos aplicados a las industrias Farmacéutica, Bioquímica y Alimentaria. Uno de los temas comprendidos es Cinética Química en el que se estudian reacciones de 1ro, 2do, y 3er orden, además del efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción. El orden de reacción tiene importancia en la interacción enzima-substrato.

Teniendo en cuenta los temas estudiados en materias como Bioquímica, Microbiología General y Fisicoquímica, se ve la necesidad de que éstas tengan seriación con Enzimología - Aplicada a los Alimentos, ya que dan las bases necesarias para el estudio de la misma. (77).

A continuación se muestra el diagrama de seriación actual para la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo con orientación a Tecnología de Alimentos.



FACULTAD DE QUIMICA

PLAN DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE

SUPER QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ORIENTACION TECNOLOGIA DE ALIMENTOS "28"

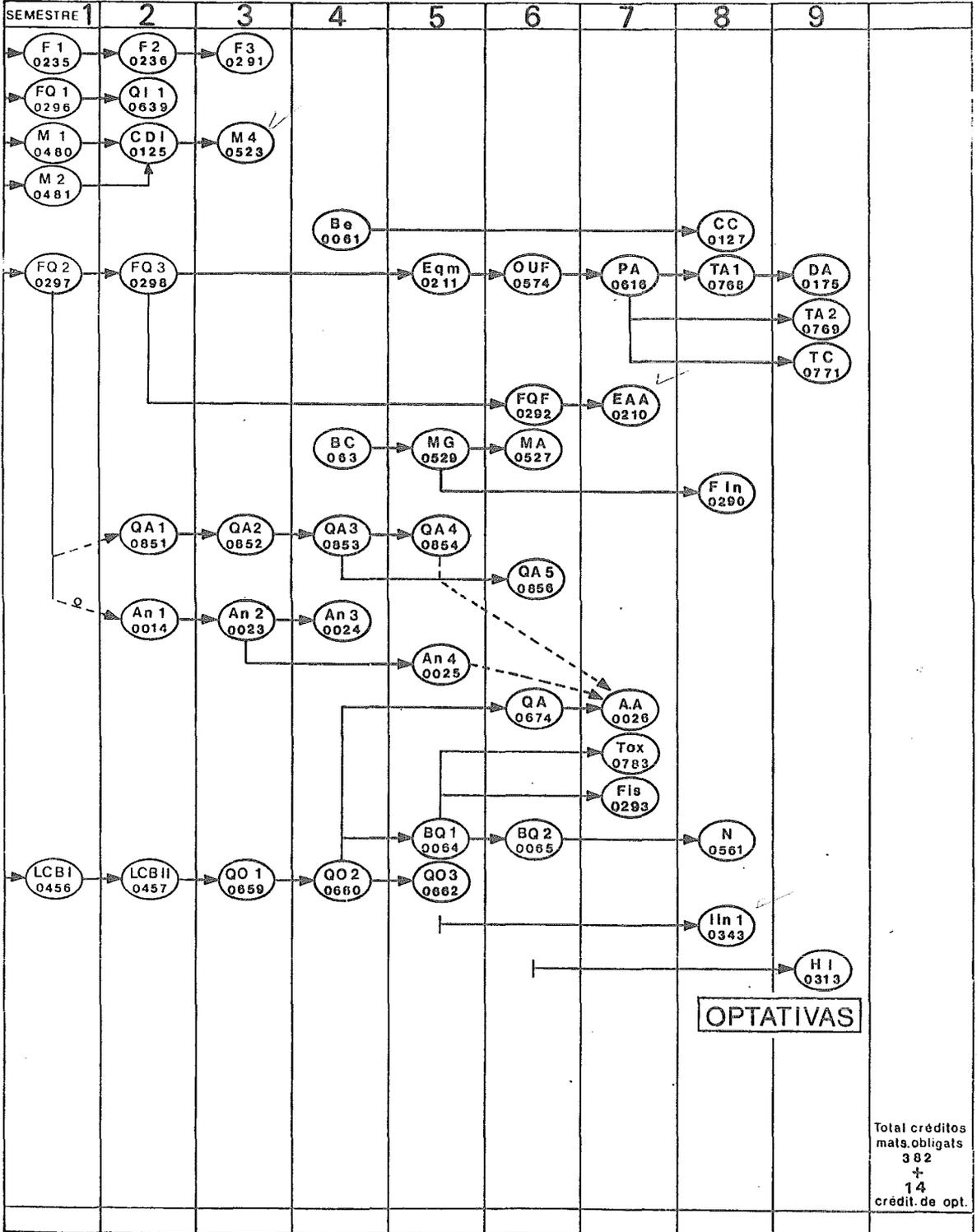
MATERIAS OBLIGATORIAS	382	CREDITOS
MATERIAS OPTATIVAS	14	CREDITOS
TOTAL	396	CREDITOS

CLAVE	MATERIA	CREDITOS	CLAVE	MATERIA	CREDITOS
<u>PRIMER SEMESTRE</u>			<u>SEPTIMO SEMESTRE</u>		
0235	FISICA I	6	0616	PROCESOS DE ALIMENTOS	10
0296	FISICOQUIMICA I	6	0210	ENZIMOLOGIA APLICADA A LOS ALIMENTOS	7
0480	MATEMATICA I	10	0293	FISIOLOGIA	9
0481	MATEMATICA II	8	0783	TOXICOLOGIA	7
0297	FISICOQUIMICA II	6	0026	ANALISIS DE ALIMENTOS	10
0456	LABORATORIO DE CIENCIA BASICA I	10	<u>OCTAVO SEMESTRE</u>		
<u>SEGUNDO SEMESTRE</u>			0127	CONTROL DE CALIDAD	9
0236	FISICA II	6	0768	TECNOLOGIA DE ALIMENTOS I	9
0639	QUIMICA INORGANICA I	10	0290	FERMENTACIONES INDUSTRIALES	10
0125	CALCULO DIFERENCIAL E INTEGRAL	12	0561	NUTRICION	9
0298	FISICOQUIMICA III	6	0343	INGENIERIA INDUSTRIAL I	6
*	An. ó Q.A. (ver diagrama de seriación)	6	<u>NOVENO SEMESTRE</u>		
0457	LABORATORIO DE CIENCIA BASICA II	10	0175	DESARROLLO DE ALIMENTOS	9
<u>TERCER SEMESTRE</u>			0769	TECNOLOGIA DE ALIMENTOS II	9
0291	FISICA III	8	0771	TECNOLOGIA DE CEREALES	9
0523	MATEMATICA IV	6	0313	HIGIENE INDUSTRIAL	6
*	An. ó Q.A. (ver diagrama de seriación)		<u>MATERIAS OPTATIVAS</u>		
0659	QUIMICA ORGANICA I	18	0019	AZUCAR I	8
<u>CUARTO SEMESTRE</u>			0082	BIOSINTESIS MICROBIANA DE APLICACION INDUSTRIAL	8
0061	BIOESTADISTICA	6	0209	ENOLOGIA	7
0063	BIOLOGIA CELULAR	6	0294	FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA DE MICROORGANISMOS	8
*	An. ó Q.A. (ver diagrama de seriación)		0344	INGENIERIA INDUSTRIAL II	7
0660	QUIMICA ORGANICA II	18	0526	MICROBIOLOGIA AGRICOLA	8
<u>QUINTO SEMESTRE</u>			0628	PRODUCTOS NATURALES	7
0211	ESTEQUIOMETRIA	8	0681	RELACIONES HUMANAS	6
0529	MICROBIOLOGIA GENERAL	8	0770	TECNOLOGIA DE ALIMENTOS III	7
*	An. ó Q.A. (ver diagrama de seriación)		0782	TECNOLOGIA DE MALTA Y CERVEZA	7
0064	BIOQUIMICA I	9			
0662	QUIMICA ORGANICA III	10			
<u>SEXTO SEMESTRE</u>					
0574	OPERACIONES UNITARIAS FARMACEUTICAS	8			
0292	FISICOQUIMICA FARMACEUTICA	11			
0527	MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS	10			
0065	BIOQUIMICA II	7			
0674	QUIMICA DE ALIMENTOS	6			

* Puede escoger la línea de Análisis ó de Química Analítica (ver diagrama de seriación)

DIAGRAMA DE SERIACION

ORIENTACION TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

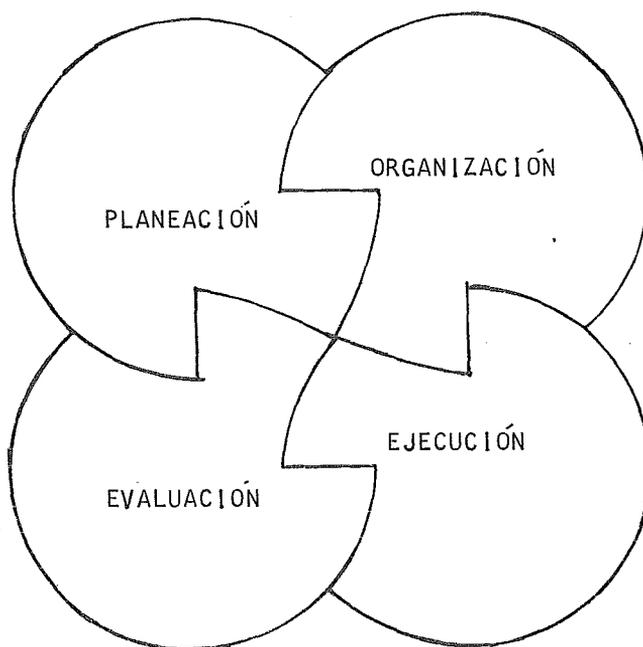


Total créditos
mats.obligats
382
+
14
crédit. de opt.

VER CLAVES AL FRENTE

4. ASPECTOS DIDÁCTICOS CONSIDERADOS EN EL DISEÑO Y DESARROLLO DE LAS PRÁCTICAS DE ENZIMOLOGÍA APLICADA A LOS ALIMENTOS.

Algunas materias como Enzimología, necesitan prácticas de laboratorio para confirmar su teoría, adquirir destreza manual y criterio para resolver problemas. Las etapas consideradas en el diseño y desarrollo de las prácticas son:



1. PLANEACIÓN

Consiste en seleccionar, jerarquizar y relacionar las actividades y procedimientos necesarios para cumplir los objetivos propuestos en un tiempo determinado. Su realización se basa en los siguientes aspectos:

- a) Establecimiento de objetivos.
- b) Distribución del tiempo y carga de trabajo.
- c) Metodología de trabajo.
- d) Selección de recursos.

2. ORGANIZACIÓN

Consiste en desarrollar los factores considerados en la planeación respondiendo a las preguntas: ¿Por qué?, ¿Qué?, ¿Dónde?, ¿Cuándo?, ¿Quién?, y ¿Cómo?.

a) Establecimiento de objetivos

Las prácticas se dividen en tres ciclos. En el primero se trabajará con enzimas comerciales de origen animal, vegetal y microbiano para que el alumno conozca, identifique y compare los diferentes tipos de enzimas; maneje y comprenda los fundamentos de las técnicas adecuadas al laboratorio. En el segundo, se obtendrá una enzima microbiana. El alumno practicará las habilidades adquiridas en el primer ciclo y

las aplicará en el segundo con la orientación de su profesor de prácticas.

El tercer ciclo comprende la adición de enzimas comerciales y obtenidas en el laboratorio, a diversos alimentos; se activarán e inhibirán las presentes en los mismos con el objeto de recopilar, organizar, analizar y aplicar los conocimientos adquiridos en los ciclos anteriores, para la elaboración de productos alimenticios.

b) Distribución del tiempo y carga de trabajo

A continuación se da un diagrama en el que se indican las semanas disponibles y la distribución de la carga de trabajo en un semestre.

SEMANAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
INTRODUCCIÓN																
IDENTIFICACIÓN																
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA																
ACTIVACIÓN E INHIBICIÓN																
PRUEBAS DE PRECIPITACIÓN																
ESTABILIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS																
INDUCCIÓN																
REGULARIZACIÓN																
APLICACIÓN: E. OBTENIDA																
APLICACIÓN: E. COMERCIAL																
APLICACIÓN: INHIBICIÓN DE ENZIMAS																
APLICACIÓN: ACTIVACIÓN DE ENZIMAS																
APLICACIÓN: MEDICIÓN DE CONT. E.																
EVALUACIÓN																
PRÁCTICAS.	PRIMER CICLO: SEMANAS 1-8 SEGUNDO CICLO: SEMANAS 2-8 TERCER CICLO: SEMANAS 11-15															

c) Metodología de trabajo

El método sugerido comprende la unificación de los dos sistemas de enseñanza: el tradicional y el activo, de manera que el alumno no sólo sea receptor en el curso de la clase o práctica, sino que exponga, dialogue, discuta y saque conclusiones con el profesor y sus compañeros, además de que busque la información que éste le deje como trabajo de investigación. El profesor, tiene la función de dirigir al alumno para que se interese en la materia induciéndolo a un razonamiento con ejemplos prácticos de los problemas que se le pueden presentar cuando sea profesionalista.

Entre las ventajas del método activo está la agilización de la enseñanza y la diversificación de la información ya que ésta se busca tanto por el maestro como por el alumno. En el proceso activo, el alumno participa de una manera dinámica. Si el sistema está bien dirigido por el profesor y si el alumno se interesa en la materia, se tendrán buenos resultados.

En el método tradicional, el maestro se limita a dar información y el alumno a recibirla pasivamente. En éste método, el maestro expone en su clase los puntos clave del tema a estudiar de una manera disciplinada ahorrándole al alumno el tiempo para buscar ésta información básica.

Entre las desventajas del método activo se encuentra el hecho de que si, el alumno no está previamente preparado para realizar una función de investigación activa, entonces el proceso de enseñanza-aprendizaje no alcanzará los objetivos propuestos. (1, 42, 49)

Las actividades programadas para cada semana en el laboratorio de manera general son:

1. Trabajo Bibliográfico: consistirá en investigar los fundamentos de la práctica que se desarrollará en la siguiente semana.

2. Recopilación del trabajo bibliográfico de la semana anterior.

3. Trabajo práctico: desarrollo de la práctica asignada, la cual ha sido investigada previamente por medio del trabajo bibliográfico y discutida con el profesor de prácticas en grupo o individualmente.

4. Entrega de reporte de la práctica realizada.

5. Semanas de regularización (9,10 y 16): servirán para discutir el trabajo realizado hasta ése momento, resolver dudas y efectuar la evaluación de los alumnos.

6. Tipos de evaluación sugeridos:

A. Evaluación del trabajo bibliográfico

B. Observación del alumno al realizar la práctica.

C. Evaluación del cuestionario y del informe de trabajo.

D. Exámen parcial al término del segundo ciclo.

E. Exámen global al término del tercer ciclo

d) Selección de recursos

Entre los recursos a considerar en la organización del programa se encuentran materiales de apoyo (equipo, reactivos, etc), tiempo, dinero disponible, nivel de los alumnos al iniciar el curso, selección de teorías y técnicas del proceso enseñanza-aprendizaje aplicables al programa y las actividades (prácticas de laboratorio, visitas a industrias, conferencias y otros). (42)

3. EJECUCIÓN

Antes de realizar las actividades, es necesario conocer si cada uno de los alumnos está preparado para abordar el tema por medio de una prueba previa que puede ser escrita, oral o práctica. Después de realizada, tal vez sea necesario añadir o eliminar objetivos del programa. (42)

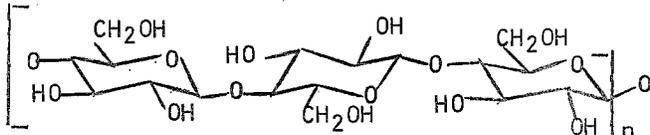
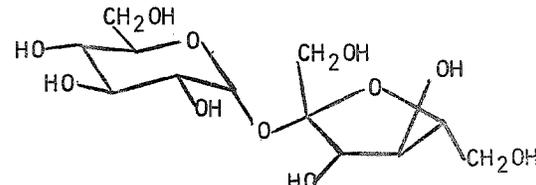
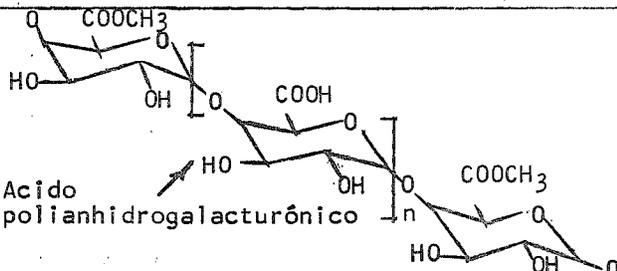
4. EVALUACIÓN

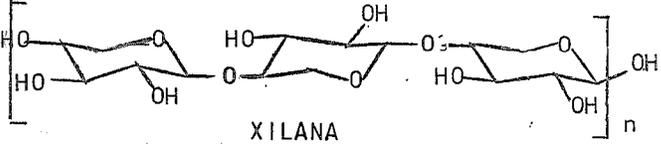
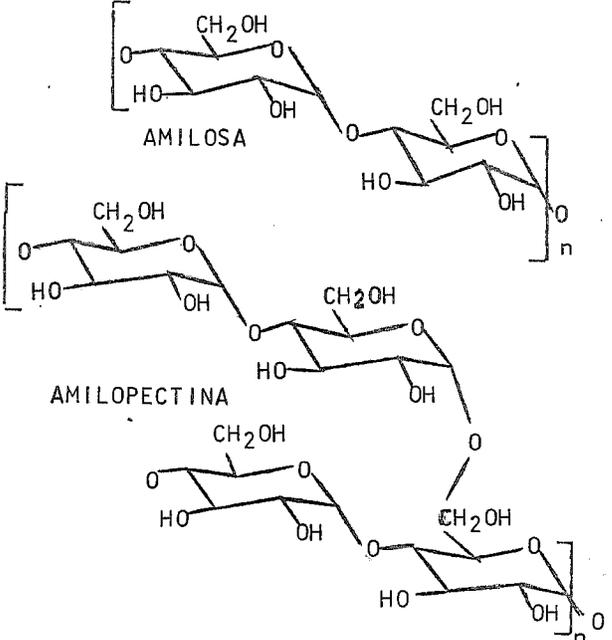
Con la evaluación se logran dos fines. El primero consiste en averiguar el grado en que el estudiante ha alcanzado los objetivos por medio de pruebas escritas (exámenes, reportes, cuestionarios), exámen oral, preguntas en clase, discusión individual o en equipo, pruebas de capacidad y destreza (manejo de materiales y equipo de laboratorio). La evaluación se debe realizar al iniciar el curso, durante el mismo y al finalizar éste.

El segundo fin, de igual importancia, es detectar si hay puntos débiles en el plan de instrucción como por ejemplo: si el profesor está insistiendo en temas que el alumno ya conoce a la perfección o ha supuesto que el estudiante tenía los conocimientos previos necesarios para desarrollar el tema; si el ritmo de enseñanza es demasiado lento o rápido; si el estudiante encuentra algunas partes confusas, carentes de interés o demasiado difíciles. (42)

5. INFORMACIÓN GENERAL

A. SUSTRATOS IMPORTANTES SOBRE LOS QUE ACTUAN ALGUNAS ENZIMAS EMPLEADAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

SUSTRATO	ESTRUCTURA	PROPIEDADES	ESQUEMA
CELULOSA (10,20,27 35,51,61 62)	Polímero lineal de glucosas beta(1-4) unidas entre sí por puentes de hidrógeno.	Insoluble en agua ácidos o bases. Soluble en soln. caliente de NH ₄ OH con iones de zinc. Ataque enzimático difícil. Función estructural.	 <p>CELULOSA</p>
SACAROSA (10,20,33 35,37,51 61,62)	Alfa D glucosa y beta D fructosa unidas por enlace glucosídico entre los C 1 y C 2 de glu y fru.	No es azúcar reductor. Soluble en agua. No contiene grupos aldehído o cetona libres. No muestra mutarrotación en solución. Función energética.	 <p>SACAROSA</p>
PECTINA (9,10,20 51,61,62)	Ac. Polianhidrogalacturónico con COOH total o parcialmente metoxilados y total o parcialmente neutralizados por bases.	Función estructural. Soluble en agua. Puede formar gel con azúcar y ácido. Variables contenidos de metoxilos y del grado de neutralización.	 <p>Acido polianhidrogalacturónico</p>

<p>HEMICELULO LOSA (10,20,27 35,51,61 62)</p>	<p>Homopolímeros de D xilosa unidos por en lace beta(1-4)</p>	<p>Función estructural. Cambian el nombre según el constituyente. Insolubles en agua. Se extraen con soln. al 4-5% de NaOH.</p>	 <p>XILANA</p>
<p>ALMIDON (10,11,14 20,35,38 47,51,53 61,62,85)</p>	<p>Compuesto de: <u>AMILOSA</u>; presente del 15 al 25%. Son glucosas con uniones alfa (1-4). Da color azul intenso frente al iodo.</p> <p><u>AMILOPECTINA</u> Es ramificada Son glucosas con uniones alfa(1-4) en 95% y alfa(1-6) en 5%. Da color púrpura frente al iodo.</p>	<p>El almidón es insoluble en agua fría y soluble en agua caliente.</p> <p>La amilosa es soluble en agua.</p> <p>La amiloéctina es insoluble en agua.</p>	 <p>AMILOSA</p> <p>AMILOPECTINA</p>

PROTEINA.
(6,9,10,
20,35,51,
61,64,78,
92)

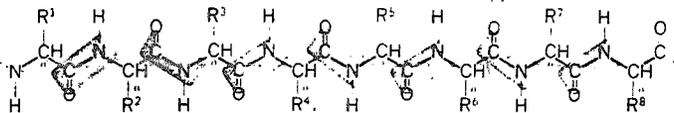
Formadas por alfa aminoácidos unidos por enlaces amídicos covalentes o enlaces peptídicos para formar péptidos que se unen y forman polipéptidos y que constituyen las proteínas.

Sus niveles de estructura son:
Primaria
Secundaria
Terciaria y
Cuaternaria.

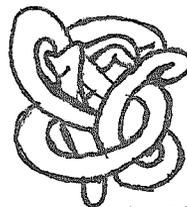
Se clasifican por su:
Función (transporte, Almacenamiento, etc)
Solubilidad (globulares, y escleroproteínas que se dividen en globulinas albuminas, prolaminas, glutelinas, e histonas)

Valor nutritivo por su contenido y relación de los aminoácidos esenciales:
lisina, triptófano, fenilalanina, treonina, valina, metionina, leucina, isoleucina se dividen en:
a) Proteínas de alto valor nutritivo.
b) Proteínas de bajo valor nutritivo.

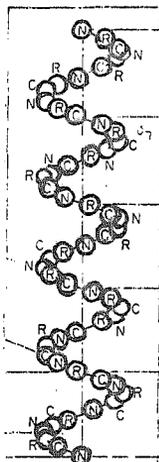
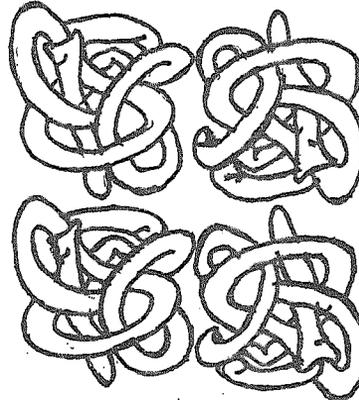
ESTRUCTURA PRIMARIA



ESTRUCTURA TERCIAARIA



ESTRUCTURA CUATERNARIA



ESTRUCTURA SECUNDARIA DE ALFA HÉLICE

LÍPIDOS .
(10,12,20
35, 51,53
61, 62,92)

Esteres de
ácidos grasos
y glicerol

La unión ester es
susceptible de hi-
drólisis ácida y
alcalina. Insolub-
les en agua.
Solubles en solven-
tes orgánicos.

Se clasifican en:

ACILGLICEROLES

(triglicéridos.
Los de origen ve-
getal son líquidos
a temperatura am-
biente. Poseen
ácidos grasos insa-
turados).

FOSFOLÍPIDOS

Formados por gli-
cerol, ácidos grasos
y una base ni-
trogenada.

ESFINGOLÍPIDOS

Relacionados con
tejidos y membranas

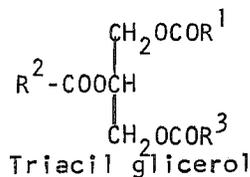
GLICOLÍPIDOS

Derivados prima-
rios de un carbohi-
drato-glicerol.

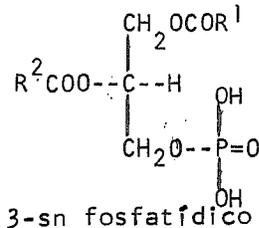
LÍPIDOS TERPENOIDES

La unidad isopre-
noide puede formar
compuestos como hule
carotenoides, este-
roides, etc.

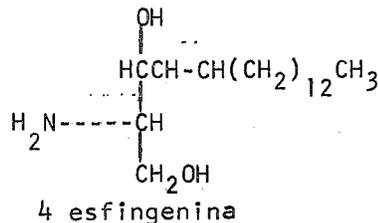
ACILGLICEROLES



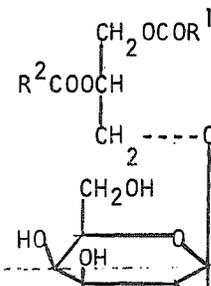
FOSFOLÍPIDOS



ESFINGOLÍPIDOS

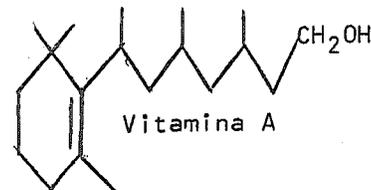


GLICOLÍPIDOS



3-sn monogalactosil diacil glicerol

TERPENOIDES



B. ASPECTOS PRINCIPALES DE ALGUNAS ENZIMAS USADAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

(* No se encontraron datos en la bibliografía consultada.

NOMBRE Y FUENTE	CARACTERISTICAS	SUSTRATO	pH OPTIMO	T OPTIMA	ACTIVADOR INHIBIDOR
Alfa - amilasa animal vegetal micro - biana 13, 14, 25, 43, 69, 78, 91.	Endo enzima. Hidroliza la unión alfa(1-4). Sitio Activo: grupo carboxilo de ac. aspártico o glutámico grupo imidazol de histidina. Al agregar Cl^- se solventa el NH_3 y aumenta la actividad.	ALMIDÓN.	4.5 a 7.0 según la fuente.	25 a 30°C alfa amilasa bacteriana sobre temperatura de 65 a 75°C a pH 6.0	Activador: agentes reductores Ca la estabiliza. Inhibidor: ácidos y álcalis a alta conc. y temperatura. iones de metales pesados. EDTA.
Beta-Amilasa Plantas superiores y algunos microorganismos. 13, 14, 25, 43, 69, 78, 91.	Exo enzima. Remueve unidades de maltosa de los finales no reductores de cadenas de polisacáridos Hidroliza la unión alfa (1-4) e invierte la configuración. Sitio Activo: grupos -SH y probablemente -COOH.	ALMIDON	5.0 a 6.0	20 a 30°C	Activador: glutathion reducido y suero de albúmina Inhibidor: ácidos y temperatura elevada. iodoacetamida, maleimida, p-Cl mercuribenzoato ciclodextrinas.

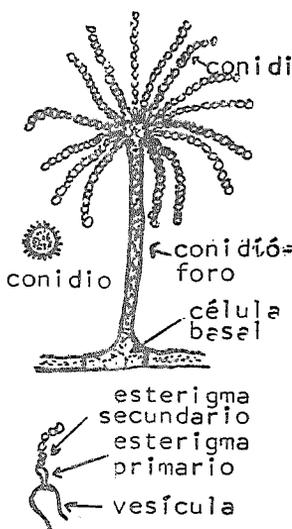
<p><u>Celulasa</u> Hongos Bacterias animales que digieren madera. rumen. comprenden I CELULASA II BETA 1,4 GLUCANASA III BETA 1,4 GLUCOSIDASA. 78,91.</p>	<p>Existen 3 tipos: Cristalina: rompe los puentes de hidrógeno Beta 1 glucanasa: es endo y exo.(1-4) rinde cadenas de 5 a 7 unidades de glucosa. <u>Sitio Activo:</u> NH₂ -COOH -SH</p>	<p>I CMC (I) : CELULOSA (I) : CELOBIOSA (II) CELOHEXOSA (III)</p>	<p>Cercano a la neutralidad. pH óptimo 5.5-6.0</p>	<p>35 a 55 °C</p>	<p><u>Activador:</u> cisteína colorantes ácidos: rojo congo eritrocina <u>Inhibidor:</u> iones de metales pesados Reactivos -SH oxidantes reductores glucosa</p>
<p><u>Invertasa</u> Animal Vegetal Microbiana. 43,78,91</p>	<p>Hidroliza el enlace de glucosa - fructosa <u>Sitio Activo:</u> Histidina y grupos tioles.</p>	<p>SACAROSA</p>	<p>4.5 a 5.5</p>	<p>35 °C</p>	<p><u>Inhibidor:</u> todo metales pesados (Ag,Hg, Cu, Zn).</p>
<p><u>Beta-Galactosidasa</u> <u>Lactasa</u> Animal Microbiana 43,78,91.</p>	<p>Hidrólisis de Beta-D galactosido... y alfa-L arabinósidos. Sobre lactosa rinde glu y galactosa. <u>Sitio Activo:</u> El -SH actúa como ácido protonando el O del glicósido y el imidazol como nucleófilo y ataca Cl de glucósido.</p>	<p>LACTOSA</p>	<p>6-7 4-4.5 segun fuente 7.7 en ausencia de NaCl.</p>	<p>30 a 50 °C</p>	<p><u>Activador:</u> comp. reductores. cisteína sulfito de sodio. <u>Inhibidor:</u> Hg, Cu, Fe nitrofenil tiogalactósidos. galactosa</p>

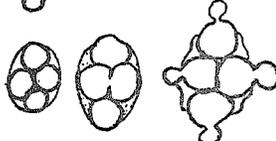
<u>Poligalacturonasa Vegetal</u> Hongos Bacterias 9,43,78,90,91.	Hidroliza enlaces glicosídicos de las sustancias pécticas en presencia de agua. Son endoenzimas o exoenzimas se dividen en cuatro según su acción. <u>Sitio Activo:</u> Grupos <u>-COOH</u> y grupo imidazol.	PECTINA AC. PÉCTICO	4.5 a 6.0 pH óptimo 3.5-4.2 a 55-60°C	Resiste altas temperaturas. Es activa después de calentarla a 100°C por 15 minutos	<u>Activador:</u> Ca <u>Inhibidor:</u> Polifenólicos Calor
<u>Pectato-Tiasa</u> Hongos Bacterias 9,43,78,90,91.	Remueve grupos de hidrógeno de C4 y C5 por transeliminación de los enlaces glucosídicos. Son endo o exoenzimas Las endo actúan sobre pectina Las exo en ác.péctico	PECTINA AC. PÉCTICO	8.0 a 9.0	45°C	<u>Activador:</u> requiere mucho Ca. <u>Inhibidor:</u> EDTA
<u>Pectin-Tiasa</u> Hongos 9,43,78,9091.	Remueve grupos de hidrógeno de C4 y C5 por transeliminación. No requiere agua	PECTINA	4.5 a 6.0	(*)	<u>Activador:</u> fosfatos citratos <u>Inhibidor:</u> Calcio exceso de sustrato.
<u>Hemicelulasa.</u> Hongos, animales que digieren madera 90	Su acción depende del sustrato sobre el que actúa.	ARABINANAS MANANAS, XILANAS ETC.	3.5 a 4.5	50 a 60°C	<u>Inhibidor:</u> 85°C en realidad es desnaturación en este caso.

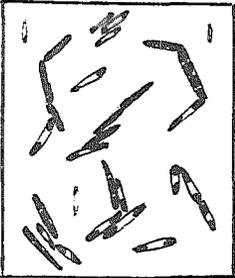
<p><u>Gama-Amilasa</u> Bacterias y Hongos glucoamilasa. 14, 25, 43, 69, 78, 91.</p>	<p>Exo enzima. Remueve unidades de glucosa de los finales no reductores de cadenas de sustratos. Produce glucosa. Hidroliza uniones alfa (1-4) alfa(1-6) y alfa(1-3). Invierte la configuración. <u>Sitio activo:</u> Dos grupos -COOH uno protonado y otro ionizado.</p>	<p>ALMIDÓN MALTOSA AMILOSA AMILOPECTINA</p>	<p>4.0 a 4.4</p>	<p>50 a 60°C</p>	<p><u>Activador:</u> Magnesio <u>Inhibidor:</u> Cualquier sustancia que inhiba los grupos -COOH</p>
<p><u>Amilo-glucosidasa (1-6)</u> Microbiana Vegetal 78, 91.</p>	<p>Enzima desramificante. Hidroliza uniones alfa (1-6). Produce glucosa del lado no reductor.</p>	<p>PULULANA ALMIDÓN</p>	<p>5.0 a 7.0</p>	<p>(*)</p>	<p>(*)</p>
<p><u>Pectin-metil estearasa</u> Vegetal Microbiana 9, 17, 43, 78, 91.</p>	<p>Remueve grupos metilo de las sustancias pecticas metiladas.</p>	<p>PECTINA</p>	<p>5.0 a 8.0 (según fuente) pH óptimo 7.5</p>	<p>hasta 50 grados centígrados</p>	<p><u>Activador:</u> NaCl, Ca iones metálicos <u>Inhibidor:</u> Calor Polifenólicos.</p>
<p><u>Glucosa-oxidasa</u> Microbiana</p>	<p>Oxida glu. a ác. glucónico. Funciona como deshidrogenasa 78, 91.</p>	<p>GLUCOSA</p>	<p>4.5 a 7</p>	<p>30°C</p>	<p><u>Activador:</u> FDA <u>Inhibidor:</u> quelantes Cu</p>

<p><u>Lipasa pancreática</u> Animal 12, 14, 43, 78.</p>	<p>Actúa en la interfase agua-lípido. Pueden hidrolizar 1,2 ó los 3 enlaces de triglicéridos Actúan en un medio con micelas <u>Sitio Activo:</u> S-S, -SH serina, histidina</p>	<p>LIPIDOS</p>	<p>6-7</p>	<p>37°C</p>	<p><u>Activador:</u> Cisteína cianida Cl⁻ <u>Inhibidor:</u> Compuestos surfactantes, DFP</p>
<p><u>Papaina Vegetal</u> 26, 43, 58, 64, 78, 91.</p>	<p>Es endopeptidasa, hidroliza grupos amino de los alfa amino sustituidos (arg, lis, glutamina, his, gli, tir) <u>Sitio Activo:</u> -SH. Presenta un S-S</p>	<p>GELATINA ALBUMINA DE HUEVO. SEGUN ELpH CASEINA</p>	<p>6-7 7.5 a 8.3 según temperatura</p>	<p>25°C</p>	<p><u>Activador:</u> Reductores HCN S⁻ EDTA cisteína NaCl <u>Inhibidor:</u> oxidantes pH 4 T alta metales pesados S-H</p>
<p><u>Renina Animal</u> 2, 43, 64, 78, 90, 91</p>	<p>Proteasa ácida, rompe el enlace de fenilalanina y metionina de la cappa caseína <u>Sitio Activo:</u> Dos COOH</p>	<p>GELATINA CASEINA</p>	<p>2 a 4</p>	<p>35°C</p>	<p><u>Inhibidor:</u> Agentes diazo fenilacil bromuro</p>
<p><u>Polifenol oxidasa</u> Hongos Vegetal 78, 90, 91.</p>	<p>Catalizan dos tipos de reacciones: hidroxilación de monofenoles a o-difenoles y eliminación de hidrógeno de o-difenoles a o-quinona. <u>Sitio activo:</u> Cu.</p>	<p>COMPUESTOS FENOLICOS DE FRUTAS Y VEGETALES.</p>	<p>6-7 segun fuente</p>	<p>25 a 30</p>	<p><u>Inhibidor:</u> H₂S O₂ azida de Na sulfito de sodio.</p>

C. PRINCIPALES MICROORGANISMOS USADOS EN LA OBTENCIÓN DE ENZIMAS.
APLICABLES A LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

MICROORGANISMO	PROPIEDADES DEL GRUPO	PROPIEDADES DEL MICROORGANISMO
<p>Aspergillus niger</p> <p>HONGO</p> <p>(3,9,15,29,32,41,55,75,81,85)</p> <p>esterigma</p>  <p>conidio</p> <p>conidio</p> <p>conidióforo</p> <p>célula basal</p> <p>esterigma secundario</p> <p>esterigma primario</p> <p>vesícula</p>	<p><u>HONGOS</u></p> <p>No contienen clorofila, Son multicelulares y se se debe considerar la forma en que se asocian Comprenden cuatro clases: Ficomycetos, Ascomycetos, Basidiomycetos y hongos imperfectos o mohos, Los tres primeros se reproducen por esporas sexuales en el último la reproducción es asexual.</p> <p>Algunos mohos tienen importancia en fermentación y conservación de alimentos. Los mohos están formados por filamentos o hifas. Incluyen los géneros: Aspergillus y Penicilium</p>	<p><u>ASPERGILLUS.</u></p> <p>Septado, micelio ramificado. En la porción distal, el conidióforo se hincha formando una vesícula que soporta los esterigmas de los que se desprenden los conidios.</p> <p>Esterigmas sencillos o compuestos y coloreados o incoloros. Conidios en cadena de color generalmente verde, marrón o negro. Puede presentar algún otro color.</p> <p>Algunos crecen a 37 °C o mas. Necesitan para su crecimiento: N, C, H, O, S, K, P, Mg y otros.</p> <p><u>A. niger.</u> Ocurre en granos, frutos, vegetales fibras y tejidos, lácteos y otros. Produce gran variedad de enzimas: amilasa, lipasa, celobiasa, maltasa, celulasa, melicitasa, cuajo, nucleasa, emulsina, peptinasa, gencianaasa, proteasa, glucosidasa, invertasa, rafinasa, tannasa, cimasa. Necesita Ni y Mg. Produce: ac. cítrico, fumarico, oxálico, glucónico, gálico, etc.</p>

Sacharomyces cereviceae	LEVADURAS	SACHAROMYCES
<p data-bbox="110 166 276 344">(3, 15, 21, 23, 29, 32, 36, 41, 44, 55, 75, 81)</p>  <p data-bbox="162 375 357 425">Saccharomyces cereviceae</p>  <p data-bbox="121 616 316 665">Germinación de ascoporas</p>  <p data-bbox="178 868 332 917">División del núcleo</p>	<p data-bbox="454 166 844 394">Pertenece a la subdivisión Talofitas, designadas como Eumicetos u hongos verdaderos porque no poseen clorofila. Se distribuyen en tres familias: - Saccharomycetaceae - Sporobolomycetaceae - Criptococcaceae</p> <p data-bbox="454 418 820 492">Se sitúan entre las bacterias y hongos superiores en cuanto a tamaño.</p> <p data-bbox="454 517 649 548"><u>Reproducción:</u></p> <p data-bbox="454 566 836 646">Por gemación (vegetativa) que puede alternar con la simple escisión.</p> <p data-bbox="454 671 820 745">Las células individuales suelen ser esféricas, ovoides o elipsoideas.</p> <p data-bbox="454 770 844 899">No poseen flagelos y son inmóviles. Se aíslan del suelo, viñedos, huertos, uvas, manzanas, frutos dulces, limón, hojas, etc.</p>	<p data-bbox="950 147 1469 455">S. cereviceae se utiliza en la industria para fabricar alcohol, vino, cerveza, cognac, ron, whisky y pan, cepas de su especie, etc. Puede ser aerobio o anaerobio, en el primer caso asimila la mayoría de los carbohidratos disponibles y la energía necesaria para el crecimiento y reproducción, la obtiene vía aerobiosis. En el segundo, los carbohidratos disponibles se fermentan y dan alcohol y CO₂.</p> <p data-bbox="950 474 1469 628">Fermenta fácilmente: glu, fru, man, sacarosa, maltosa. Con dificultad la galactosa. La rafinosa es fermentada por levaduras de fondo, pero solo una tercera parte por levaduras superficiales.</p> <p data-bbox="950 628 1437 702">La lactosa no es fermentada. T. de esporulación: Máx: 35-37°C Mín: 9-11°C, óptima: 30°C.</p> <p data-bbox="950 702 1469 985">Necesita: C (melasas, a.a. en pequeña cantidad, ác. láctico, alcohol etílico, etc). N (agua amoniacal, sales amónicas, peptonas, péptidos, aminoácidos o urea). Los nitratos y nitritos no son asimilables. Fósforo (fosfatos). Mg. y vitaminas. Cofactores bios (biotina, ác. pantoténico e inositol) pH 3.5 a 4.5. La enzima que produce principalmente es invertasa.</p>

Bacillus subtilis	<u>BACTERIAS</u>	<u>BACILLUS</u>
<p data-bbox="131 303 310 483">(3, 15, 29, 32, 34, 41, 55, 75, 81, 85).</p>  <p data-bbox="186 936 399 1034">Gránulos metacromáticos de Bacillus subtilis.</p>	<p data-bbox="505 274 886 429">El esporangio no difiere de las células vegetativas excepto cuando se abulta por esporas más largas que el diámetro de la célula.</p> <p data-bbox="505 454 899 580">Son esporangios en forma de huso cuando las esporas son centrales, o en forma de cuña si son terminales.</p> <p data-bbox="505 606 870 662">Son gram positivo por lo general.</p> <p data-bbox="505 687 870 864">Es rara la presencia de pigmentos. Son aerobios microaerófilos y anaerobios. Licúan fuertemente la gelatina, fermentan los azúcares. En algunos casos forman gas.</p> <p data-bbox="505 889 870 1122">Algunas especies son termófilas con crecimiento rápido a 55°C. Son principalmente saprófitas y se encuentran comúnmente en el suelo unos pocos en animales como insectos, parásitos o patógenos.</p>	<p data-bbox="1032 274 1520 473">Familia: bacillaceae (células de forma alargada capaces de producir esporas, con flagelos periféricos o inmóviles. Las endosporas son cilíndricas, elipsoidales o esféricas y son localizadas en la parte central, subterminal o terminal.</p> <p data-bbox="1032 498 1503 555">Bacterias en forma alargada algunas veces en forma de cadena,</p> <p data-bbox="1032 580 1503 656">Presentan un esporangio usual - mente no diferente de las células vegetativas.</p> <p data-bbox="1032 681 1227 706">Son aerobios.</p> <p data-bbox="1032 732 1520 1173">Se encuentran presentes las catalasas. Algunos muestran colonias ásperas y formando una capa en el cultivo; oxidan los carbohidratos, producen una pequeña acidéz sin la acumulación pronunciada de productos característicos. Habitan en el suelo. Las esporas de B. subtilis (mesófilo) son menos resistentes que las de los termófilos. Algunas son amilolíticas; Determinan la hidrólisis extracelular del almidón como B. subtilis y Cl. butyricum. Entre las enzimas que produce se encuentran: amilasa, proteasa y lipasa.</p>

D. USOS GENERALES DE LAS ENZIMAS

<u>NOMBRE</u>	<u>FUENTE</u>	<u>UTILIZACION</u>	<u>INDUSTRIA</u>	<u>REF.</u>
Amilasa	Malta	Transformación del almidón en dextrinas y azúcar fermentable. Se usa en el malteado y para dar cuerpo a la cerveza.	1,2	59,87 80
Amilasa	hongos	Acelera la fermentación del pan, da volumen a la hogaza, color a la costra, textura y sabor al migajón.	3	43,76,78 87,80
Amilasa	Hongos	Degradación del almidón previamente licuado a jarabes ricos en maltosa.	4	80,83,91
Amilasa	Bacteriana.	Eliminación de turbidez indeseable, conversión del almidón en azúcar fermentable especialmente los adjuntos de la malta.	1,2	78,86,87 80
Amilasa	Bacteriana	Licuefacción del almidón para permitir un flujo libre en la elaboración de chocolate y cocoa.	5	80,91
Amilasa	Bacteriana	Recuperación de azúcar de desechos de la manufactura de dulces.	5	80,87
Amilasa	Bacteriana	Solubilización del almidón para clarificación de jugos de frutas.	6	78,80
Amilasa	Bacteriana	Retarda el proceso de retrogradación del almidón y el envejecimiento del pan.	3	80,87
Amiloglucosidasa	Hongos	Hidrólisis de amilosa y amilopectina a glucosa.	4	78,91

glucosa isomerasa	hongos	Conversión de jarabes de glucosa en productos más dulces que contienen fructosa en cierta proporción.	4	33,78,91
Glucosa oxidasa Catalasa.	Hongos	Eliminación de O ₂ y/o glucosa de (cerveza, bebidas carbonatadas, huevo deshidratado, queso, carne, leche en polvo jugos, pescado, vino, etc, Estabilizar tepenos de los cítricos.	7	76,78,86 91.
Invertasa	levaduras.	Eliminación de la cristalización. Licuefacción de centros de dulces.	5	43,73,76 87
Pectinasa	Hongos	(Licuefacción de centros) de dulces. Hidrólisis de la pectina durante la fermentación del cacao.	5	17,43,76 91
Pectinasa	Hongos	Hidrólisis del recubrimiento gelatinoso de la fruta durante la fermentación.	8	17,76,91
Pectinasa	Hongos	Hidrólisis de la pectina de la pulpa de la aceituna que permite mejor extracción del aceite.	9	17,76,91
Pectinasa	cítricos	Evita la gelatinización de concentrados de cítricos Clarificación espontánea de los jugos.	6	9,17,43 78,87
Pectinasa	Hongos	Clarificación, aumento de rendimiento, facilidad de filtración, evita gelatinización en jugos y vinos.	6	9,17,78 86,87,91
Glucanasa	bacteriana	Aceleración de la filtración de la cerveza por eliminación de los glucanos.	1	78

lactasa	levaduras	Eliminación de la cristalización de la lactosa. Estabilización de proteína de la leche por eliminación de la lactosa.	11	73,78,91
			10	91
Celulasa	microbiana	Degradación de celulosa en el secado del café	8	27,76,91
Celulasa	microbiana	Eliminación del carácter granuloso de peras. Pelado de duraznos, tomates, etc.	6	27,91
Celulasa	microbiana	Transformación de desperdicios, papel y aserrín en materiales nutritivos. Rompimiento de paredes celulares para liberación de proteínas. Ablandamiento de materiales vegetales.	7	27,78,91
Proteasa	Hongos bacterias	Degradación de glúten, produciendo masas extensibles suaves, de mejor movilidad, pan de mejor textura y calidad. Reduce el tiempo de mezcla y libera la beta amilasa.	3	64,87
Proteasas	Hongos Bacterias	Mejora las características de proteínas. Elaboración de pasta de soya fermentada y bebidas japonesas	12	64,78,79 91
Papaina Bromelina. ficina otras proteasas	Papaya	Ablandamiento de carne	1,7	5,43,58 64,76,78 79,86,91
	Piña	Fabricación de hidrolizados de proteínas (recuperación de proteínas de huesos, glúten, soya desechos de pescado etc)		
	Higos Microbianas	Producción de aceites al separar la proteína. Estabilización de la cerveza fría al precipitar proteínas, favorece el sabor, cuerpo y filtración		
Pepsina Reni-na	Vísceras	Hidrólisis de la kappa caseína formando la leche cuajada. Desarrollo de sabor del queso durante su añejamiento.	13	2,64,73 76,78,79

Prote _{as} as	Varios	Mejora las características del secado de huevo.	7	64,79,91
Protea _{as}	Varios	Tratamiento de productos proteínicos de desecho para convertirlos en alimentos para ganado.	14	64,78,91
Lipa _{sa}	Leva- dura Hongos Bact.	Hidrólisis de lípidos (aceites y grasas) a glicerol y ácidos grasos.	9	91
Lipa _{sas}	leche	Añejamiento para prod. queso	13	43,78,90
Lipoxi _{genasa}	soya	Blanqueo de la harina	3	43,78
Esteara _{sas}	fruta	Selección del momento de cosecha, tiempo de almacén y condiciones de proceso	6	90,76
Alina _{sa}	cebolla berro ajo	Actúa sobre precursores del sabor momentos antes de su consumo al hacer cortes al alimento.	7	90
Amila _{sa}	Bacteria _{na}	Modificación del almidón para revestimiento de papel	15	43,80
		Eliminar apresto de telas	16	43,80
		Quitar empapelado de pared.	7	43,80
		Producir almidón que se hinchaba en frío para lavandería.	17	43,80
Protea _{sa}	Bacte- riana Hongos	Eliminar apresto de telas	16	43
		Macerar y depilar pieles	18	43
		Desmanchar ropa	17	43
		Recuperar plata de las películas usadas.	19	43

Las industrias se indican como sigue: 1. Cervecería, 2. Bebidas destiladas, 3. Panificación, 4. Fabricación de jarabes, 5. Confitería, 6. Frutas y vegetales 7. Diversas, 8. Fabricación del café, 9. Producción de aceite, 10. Lácteos, 11. Postres y helados, 12. Industrias que usan cereales, 13. Quesos 14. Alimento para ganado, 15. Papelera, 16. Textil, 17. Lavandería, 18. Papelería, 19. Fotográfica.

M A T E R I A L .

III. MATERIAL

A. Enzimas	50
B. Substratos	53
C. Microorganismos	54
D. Material y equipo de laboratorio	55
E. Substancias	56

III. MATERIAL

A. ENZIMAS

Las enzimas utilizadas para el desarrollo de las prácticas son las siguientes:

Enzimas obtenidas en el laboratorio

- - PROTEASA
- - LIPASA
- - AMILASA
- - INVERTASA
- - CELULASA
- - PECTINASA

Enzimas comerciales

NOMBRE DE LA ENZIMA	NOMBRE COMERCIAL	FABRICA	UNIDADES
AMILASA BACTERIANA	TENASE	ENMEX	340-370000 MWU/g
GLUCOAMILASA FUNGAL	DIAZYME	ENMEX	100 DU / g
PROTEASA BACTERIANA	H.T. PROTEOLYTIC	ENMEX	200 N U/g
PROTEASA BACTERIANA	BREW-N-ZYME	ENMEX	700 N U/g
RENINA	MARZYME	ENMEX	90-92%
MILASA FUNGAL Y PROTEASA	PANZYMA	ENMEX	800UHB/g 350SKB/g
PECTINASA	PANZYM	ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS.	(*)
EMICELULASA	- - - -	ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS.	(*)
PANCREATINA FUNGAL	- - - -	ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS.	24 NF
MILASA FUNGAL Y ROTEASA FUNGAL	P.A.F.375	ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS.	1000 SKB 3000 HUT
PECTINASA	- - - -	TRAVENOL	(*)
AMYLASE	- - - -	TRAVENOL	(*)
AMYLASE	- - - -	TRAVENOL	(*)
AMYLASE PANCREATICA PROTEASA PANCREATICA PASA PANCREATICA	PANCREATINA	BIOQUIMICA NARVEL	4NF

(*) = NO SE PROPORCIONARON DATOS

Definición de unidades

- M.W.U. Cantidad de enzima que dextriniza 100 mg de almidón soluble en 30 minutos bajo las condiciones de ensayo (ENMEX).
- D.U. Cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 g. de glucosa en 1 hora bajo las condiciones de ensayo (ENMEX).
- N.U. Cantidad de enzima que hidroliza 40% de 1 litro de sustrato de caseína en 60 segundos bajo las condiciones de ensayo. (ENMEX).
- S.K.B. 150 M.W.U. (ENMEX).
- N.F. Actividad Amilásica:
Cantidad de pancreatina que digiere 10 mg de almidón de papa seco (Reference Standard) bajo las condiciones de ensayo (NATIONAL FORMULARY).
- Actividad Lipásica:
Cantidad de pancreatina que libera 1.0 microequivalente de ácido por minuto a pH 9 a 37°C bajo las condiciones de ensayo. (NATIONAL FORMULARY).
- Actividad proteásica:
Cantidad de pancreatina que digiere 10 mg de caseína bajo las condiciones de ensayo (NATIONAL FORMULARY)
- H.U.T. 1.22 X H.U. (ENMEX)
- N.U. 1450 H.U. (ENMEX)
- NOTA: Se sugiere emplear los métodos descritos en las prácticas No.1 y No.2 .

B. SUBSTRATOS

CARBOHIDRATOS

- - Almidón
- - Sacarosa
- - Carboximetilcelulosa (CMC)
- - Pectina cítrica
- - Glucosa

PROTEINAS

- - Caseína
- - Grenetina

LÍPIDOS

- - Mantequilla
 - - Aceite de Olivo
 - - Aceites Vegetales
-

C. MICROORGANISMOS

HONGOS

- - *Aspergillus niger*.

LEVADURAS

- - *Saccharomyces cereviceae*.

BACTERIAS

- - *Bacillus subtilis*.

D. MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO

MATERIAL	EQUIPO
Frascos de boca ancha	Potenciómetro
Cajas Petri, tubos de ensayo tubos. de vidrio	Refractómetro Colorímetro
Viscosímetro, densímetro	Espectofotómetro
Pipetas vol y graduadas: (0.1,1.5,10,20,25,50 ml)	Agitador magnético parrilla eléctrica
Buretas, frascos con tapón es merilado, cuerpos de ebullición	Polarímetro Estufa
matraces eelenmeyer(250,100,500 ml)	Baño de agua
matraces aforados(100,250,500ml). agitadores, pinzas, gendarmes	Cámara de refrigeración Manómetros
Vasos de p.p. (50,100,250,500 ml) embudos, mechero, tripié, soporte	Balanza Equipo de Vacío
porta y cubre objetos papel aluminio, filtro, indicador	Bombas de Aereación Incubadora
algodón, goteros gradillas, espátulas, termómetro	Licuadora Microscopio
Pícnómetros, cronómetro tapones, mangueras, pinzas de mohr	Autoclave Centrífuga
vidrio reloj.	

E. SUBSTANCIAS

<p>Carbonato de sodio Tartrato doble de Na y K Sulfato de sodio Bicarbonato de sodio Arseniato de sodio heptahidratado Acetato de sodio Hidróxido de sodio Metabisulfito de sodio Benzoato de sodio Cloruro de sodio Tiosulfato de sodio Bisulfito de sodio Fluoruro de sodio</p>	<p>Acetona Etanol Metanol Propanol Isopropanol Elcohol polivinílico Alcohol decílico</p>
<p>Acido sulfúrico Acido cítrico Acido clorhídrico Acido acético Acido nítrico Acido 3,5 dinitrosalicílico Acido succínico Acido galacturónico Acido tricloroacético</p>	<p>Fenolftaleína Rojo de metilo Naranja de metilo Azul de metileno Azul de bromotimol</p>
<p>Glicerol Propilénglicol Sorbitol Fenol Tween 20</p>	<p>Sulfato Cúprico Sulfato de amonio Diisopropil fosfato Cloruro de plata Cloruro de mercurio Cloruro de calcio Molibdato de amonio EDTA Iodo resublimado Urea Hidróxido de potasio Ioduro de potasio Permanganato de potasio Agua oxigenada Goma arábica</p>
<p>Iodoacetamida p-mercuribenzoatos Iodobenzoatos N-etilmaleimida Cianuro de potasio Cisteína Glutatión</p>	<p>Duolita Amberlita Sephadex Acrilamida Sepharosa CMC Colágeno</p>

D I S E Ñ O Y D E S A R R O L L O

D E

P R Á C I I C A S

IV. DISEÑO Y DESARROLLO DE PRÁCTICAS

A. Presentación de las Prácticas	59
B. Desarrollo de las Prácticas	60
1. Identificación de Enzimas	60
2. Determinación de Actividad Enzimática	75
3. Activación e Inhibición Enzimática.	103
4. Pruebas de Precipitación Enzimática	110
5. Estabilización y Purificación de Enzimas.	123
6. Obtención de Enzimas por Inducción Micro biana	140
7. Aplicación de Enzimas a los Alimentos	157
1. Aplicación a los Alimentos de Enzimas Comerciales e Inducidas en el Labora- torio	171
2. Inhibición de Enzimas Presentes en los Alimentos	174
3. Activación de Enzimas Presentes en los Alimentos.	175
4. Medición del Contenido Enzimático como Índice de un Proceso.	177

A. PRESENTACION DE LAS PRÁCTICAS

PRÁCTICA 1: Identificación de Enzimas

PRÁCTICA 2: Determinación de Actividad Enzimática

PRÁCTICA 3: Activación e Inhibición de Enzimas

PRÁCTICA 4: Pruebas de Precipitación Enzimática

PRÁCTICA 5: Estabilización y Purificación de Enzimas

PRÁCTICA 6: Obtención de Enzimas por Inducción Microbiana

PRÁCTICA 7: Aplicación de Enzimas a los Alimentos

1. Aplicación a los Alimentos de Enzimas Comerciales e Inducidas en el Laboratorio
2. Inhibición de Enzimas Presentes en los Alimentos
3. Activación de Enzimas Presentes en los Alimentos
4. Medición del Contenido Enzimático como Índice de un Proceso.

B. DESARROLLO DE LAS PRÁCTICASPRÁCTICA No. 1: IDENTIFICACIÓN DE ENZIMASBASES TEÓRICAS

Las enzimas, como todo catalizador, aceleran la velocidad de una reacción sin afectar su constante de equilibrio. Por lo general actúan a temperaturas inferiores que los mismos y están básicamente constituidas por proteínas; en ocasiones, contienen un componente no protéico (COFACTOR), que puede estar representado por un carbohidrato, fosfatos, lípidos, iones metálicos o pequeños residuos moleculares orgánicos. Los cofactores pueden ser de tres tipos: GRUPO PROSTÉTICO, COENZIMA O ACTIVADOR METÁLICO. Cuando un biocatalizador contiene un cofactor, se llama APOENZIMA a la parte protéica y HOLOENZIMA al conjunto de la APOENZIMA y el COFACTOR.

Las enzimas generalmente presentan especificidad de grupo, o sea, pueden actuar sobre un grupo general de compuestos; sin embargo, a veces la especificidad es tan avanzada que la enzima tan solo puede atacar a un único sustrato.

Las enzimas pueden dividirse en clases de acuerdo a diversos sistemas. Algunos de los posibles métodos de clasificación se enumeran a continuación.

1. Lugar de acción (extracelular o intracelular)
2. Origen de la enzima (vegetal, animal o microbiano)
3. Composición química (proteína simple, metaloproteína o globular conjugada)
4. Tipo de reacción catalizada (hidrólisis, oxidación, dismutación)
5. Substrato típico afectado (carbohidrato específico, lípido, etc).

La Comisión Internacional de Enzimas, en el Simposio de la Unión Internacional de Bioquímica efectuado en 1961 acordó reglas específicas para la clasificación de enzimas.

La Comisión propuso seis clases principales basadas en el tipo de reacción catalizada, con ulterior subdivisión basada en la naturaleza de la reacción catalizada y el tipo de enlace que se forma o que se rompe. Las seis clases son: OXIDOREDUCTASAS, TRANSFERASAS, HIDROLASAS, LIASAS, ISOMERASAS, LIGASAS.

La identificación de enzimas se puede realizar de manera cualitativa observando su acción sobre diferentes sustratos por medio de cambios en el color, viscosidad, acidez y otros. De ésta manera se tiene:

- Las proteasas actúan sobre las proteínas tales como: grenetina, caseína, hemoglobina, etc.
- Las lipasas reaccionan con sustratos de mantequilla, aceite de olivo y, en general, aceites vegetales.
- Las carbohidrasas hidrolizan almidón, sacarosa, pectina, hemicelulosa y otros.

Se debe tener especial cuidado en la selección de los factores que afectan la catálisis enzimática como el pH, la temperatura, la concentración de sustrato, presencia de activadores e inhibidores, etc. (10,20,25,43,51,61,87).

OBJETIVO

El alumno identificará las enzimas proporcionadas en el laboratorio como: amilasa, invertasa, pectinasa, hemicelulasa, amiloglucosidasa, proteasa o lipasa

FUNDAMENTO

Dada la compleja estructura de las enzimas, éstas distinguen su sustrato y se combinan con él por medio de su sitio activo, el cual presenta una especificidad estereoquímica estructural, efectuando una sola reacción o un grupo de ellas muy similares. Cuando se pueden efectuar varias reacciones, la enzima acelera solamente una de ellas dejando rezagadas a las demás debido a su característica de ser catalizador directivo. En éstas propiedades se basan las reacciones que se utilizan para identificar enzimas. (43).

PROCEDIMIENTO

El análisis de identificación de enzimas se realizará de la siguiente manera:

1. Preparar diferentes sustratos para probar la acción de la enzima a identificar (almidón, sacarosa, gelatina, aceite de olivo, pectina, CMC , etc).
2. Identificar la enzima siguiendo los métodos de identificación de enzimas.
3. Reportar los resultados obtenidos y las observaciones necesarias.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

A. DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS

Los métodos pueden ser cualitativos o cuantitativos. Entre los diferentes tipos de parámetros medidos para identificar enzimas se puede mencionar:

1. DESARROLLO O PÉRDIDA DE COLORACIÓN:^{*} Se basa en la aparición o pérdida de color de un indicador determinado cuando se ha efectuado la hidrólisis parcial o total del sustrato. Un ejemplo ilustrativo podría ser el desarrollo de color azul de soluciones de Iodo frente a sustratos de almidón y la desaparición parcial o total cuando actúa la amilasa. (74, 82).

2. DETERMINACION DE CAMBIOS EN LA VISCOSIDAD:^{*} Se basa en la medida de la disminución o aumento de la viscosidad del medio de reacción después de efectuada la hidrólisis o la síntesis. Esta medición se puede efectuar por medio de un viscosímetro o por observación directa del sustrato sobre el que actúa la enzima. Un ejemplo es la disminución de la viscosidad del almidón, grenetina, pectina y CMC cuando ha actuado sobre ellos: amilasa, proteasa, pectinasa y celulasa respectivamente. (74, 82)

3. MEDICIÓN DE CAMBIOS EN EL pH:^{*} En éstas técnicas se miden los cambios producidos en el pH de la solución antes y después de actuar la enzima debido a la liberación de grupos H^+ u OH^- . Las mediciones se pueden realizar potenciométricamente, por medio de titulaciones, con papel pH o utilizando indicadores con zona de viraje conocida y limitada. El caso de los ácidos grasos liberados por la acción de una lipasa sobre un lípido puede ilustrar éste tipo de pruebas. (9)

4. MEDICIÓN DE ZONAS DE HIDROLISIS:^{*} Esta prueba está fundamentada en el hecho de que al actuar una enzima sobre un sustrato colocado en una caja petri, dejará una zona clara o HALO que se puede medir fácilmente y que indica la acción de la enzima de una manera clara. Esta prueba se puede verificar para proteasas, carbohidrasas y lipasas. (53)

5. DETERMINACIÓN DE CAMBIOS DE ESTADO:^{*} Se fundamenta en la aparición de un producto en un estado diferente al del sustrato original, como sucede en el cambio de leche a caseína precipitada bajo la acción de la renina. (2,82).

6. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR EL MÉTODO DE FEHLING:^{*} Se basa en la reducción del Cu (II) por acción del grupo aldehído libre de los monosacáridos. La sacarosa es un azúcar no reductor que por la acción de la invertasa produce glucosa y fructosa (azúcar invertido), las cuales por tener grupos aldehído libres son azúcares reductores y verifican la reacción. (71)

B. DESARROLLO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS

1. Desarrollo o pérdida de coloración (AMILASA)^{*}(74)

Reactivos:

- Buffer de ácido acético 0.02M, ajustar a pH 5 con NaOH.

- Solución I-IK: 500 mg de iodo resublimado y 5g de IK se disuelven en 100 ml. de agua. El reactivo de trabajo es 1 ml. de la solución anterior en 100 ml. de agua (Prepararla el día de la práctica).

- Solución de Almidón: 200 mg. de almidón soluble se disuelven en 100 ml. de Buffer de acetatos 0.02M pH5. Hervir la solución con agitación durante 2 min. Enfriar.

- Solución de enzima: 0.1 ml. de enzima en 10 ml. de Buffer de acetatos pH 5.

Técnica:

Colocar en un tubo de ensayo 10 ml. de solución de almidón (SUSTRATO), 4 ml. de enzima. Dejar actuar la enzima 15 min. a 35°C. Revelar con 8 ml. de la solución de I-IK. Observar contra un testigo preparado de igual manera pero sin adición de enzima. Hacer la prueba por duplicado.

Resultados:

Al observar el blanco, éste aparece coloreado de azul. Los tubos con la enzima permanecen translúcidos, lo que indica la acción de las amilasas sobre el almidón.

2. Determinación de cambios en la viscosidad: (PRO
TEASAS)* (74)

Reactivos:

- Solución de grenetina al 4%. pH 6,5
- Solución de enzima: 0.1 ml de enzima en 10 ml. de Buffer de acetatos pH 5.

Técnica:

Colocar en tubos de ensayo 10 ml. de gelatina. Añadir la enzima (4,6,8,10:ml.) Incubar a 40°C por 30 minutos. Sumergir los tubos después en agua helada o hielo. Realizar un blanco sin añadir la enzima.

Resultados:

La gelatina sin hidrolizar solidificará, mientras que la gelatina hidrolizada permanecerá líquida.

Observación:

No agitar los tubos mientras está líquida la gelatina porque puede provocarse errores al mezclarse la gelatina hidrolizada con la intacta y solidificar.

2.A. Determinación de cambios de viscosidad, (PECTINASA)

(4).

Reactivos:

- Solución de pectina al 1% pH 4.5
- Solución Buffer de acetatos pH 4.5
- Solución de enzima (0.1 ml ó 1 mg/ 10 ml buffer)

Técnica:

En un viscosímetro perfectamente limpio y seco, se hacen pasar 10 ml. de solución de pectina a 35°C, determinándose el tiempo de flujo con cronómetro. Hacer la misma operación 3 veces para tener un valor promedio del testigo.

10 ml. de solución de pectina se adicionan con 5 ml de enzima y se incuban a 35°C durante 15 min. Se toman 10 ml. del digerido y se hacen pasar por el viscosímetro perfectamente limpio, tomándose el tiempo de salida de flujo con cronómetro. Repetir la operación 3 veces para obtener un valor promedio. Realizar la misma operación usando 10 ml. de agua a 35°C.

Resultados

T_w = medida de tiempo de flujo de agua

T_i = medida de tiempo de flujo del sustrato

T_t = medida de tiempo de flujo del digerido

F_r = fluidez relativa

$$F_r = \frac{T_i - T_w}{T_t - T_w}$$

$T_t - T_w$

*

3. Medición de cambios en el pH: (PROTEASAS) (9).

Reactivos:

- Solución de caseína al 2% . pH 5
- Solución Buffer de acetatos pH 5.
- Solución de enzima (0.1 ml ó 1 mg/10 ml de buffer).
- Solución de NaOH 0.1N
- Solución de formol al 40%
- indicador de fenolftaleína.

Técnica:

En dos matraces se colocan 10 ml. de caseína. Uno de los matraces se titula con hidróxido de sodio 0.1N consti-
tuyendo la prueba testigo. Al otro matráz se le agregan 2 ml
de solución de enzima incubandose a 35°C durante 30 min.
La enzima es inactivada sumergiendola en un baño de hielo o
bien en un baño a ebullición. Posteriormente se le agregan
10 ml. de formol al 40%. Agitar varias veces y dejar reposar
Titular con NaOH 0.1N.

Resultados

El aumento de acidéz con respecto al testigo indica
una prueba positiva.

4. Medición de zonas de hidrólisis (LIPASAS) (53)

Reactivos:

- Solución saturada de sulfato de cobre.
- Solución de enzima a pH 6.3 (0.1ml/10ml)
- Solución de agar al 1.5%
- Mantequilla o aceite de olivo.

Técnica:

Fundir el agar. Colocar en una caja de Petri 30 ml. de agar fundido y 1 ml. de aceite de oliva. Mezclar y dejar solidificar. Posteriormente adicionar 3 ml. de la solución de enzima. Incubar durante una hora a 35°C. Al finalizar el período de incubación detener la reacción colocando la caja en un baño de hielo y adicionar 5 ml. de la solución saturada de sulfato de cobre. Dejar reposar durante 4-5 minutos, eliminar el exceso del reactivo y observar. Correr un testigo sin adicionar enzima.

Resultado:

El resultado es positivo si se presenta una zona de color azul-verdoso. En caso contrario será negativo.

5. Determinación de cambios de estado (PROTEASAS*) (74)

Reactivos:

10 ml. de leche

Soln. de enzima pH 5 (0.1ml/10 ml)

Técnica:

Colocar 10 ml. de leche en un tubo de ensayo y llevar a Baño María a 40°C hasta que se estabilice la temperatura. Agregar 1 ml. de la solución de enzima. Dejar actuar durante 10-15 minutos. Observar los resultados.

Resultados:

La coagulación de la leche indica una prueba positiva.

6. Determinación de azúcares reductores por el método de Fehling. (71)

Reactivos:

- Solución de sacarosa al 10% pH 4,6 (200 ml).
- Solución de enzima: 0.1 ml/10 ml de buffer pH4,6
- Solución buffer de acetatos pH 4,6
- Solución A de Fehling: disolver 34.639 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 12 g de MgSO_4 en agua y llevar a 500 ml. Filtrar si es necesario.
- Solución B de Fehling: disolver 170 g de tartrato doble de sodio y potasio y 50 g de NaOH en agua, llevar a 500 ml. Filtrar si es necesario.

- Azul de metileno al 2%

Técnica:

Colocar en dos matraces erlenmeyer 100 ml. de la solución de sacarosa en cada uno. El matrás A se adiciona con 10 ml. de la solución de enzima y ambos se ponen a incubar a 40°C durante 15 minutos, después de lo cual se reduce la actividad enzimática llevándolos a un baño de hielo. Se precipitan las proteínas con subacetato de plomo y oxalato de potasio (71). Se filtran las soluciones y se coloca una de ellas en una bureta. Por separado, se prepara un matrás erlenmeyer que contiene 5 ml. de la solución A y 5 ml. de la solución B de Fehling, 50 ml. de agua destilada y cuerpos de ebullición. Se calienta a ebullición y en éste momento se empieza a añadir la solución de la bureta. Cuando casi todo el reactivo ha pasado del color azul al rojo ladrillo (precipitado de Cu_2O), se le adicionan unas gotas de azul de metileno y se continúa agregando la solución azucarada, muy lentamente, teniendo la precaución de que el reactivo no deje de estar en ebullición. El final de la reacción se comprueba sacando breves segundos el matrás de la fuente de calor y observando la parte superior del líquido que debe ser incolora y el fondo con un precipitado rojo ladrillo. Se repite la operación con la solución que no contiene enzima (SOLUCIÓN PATRÓN).

Resultados:

La aparición del precipitado rojo ladrillo indica una prueba positiva. Reportar los resultados y observaciones.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué ventajas presenta la identificación de enzimas en los alimentos? Mencione 5 ejemplos de presencia de enzimas en los mismos.
2. ¿ En qué se basan las técnicas de identificación de enzimas proteolíticas, amilolíticas y lipolíticas?
3. ¿ De qué manera afectan el pH y la temperatura en la identificación de enzimas?
4. ¿ Cuáles son las teorías acerca de la unión de la enzima con el sustrato?
5. ¿ A qué se debe la aparición de color azul en el almidón cuando se adiciona el iodo? ¿ Cual es el componente responsable de ésta coloración? Explicar claramente

OBSERVACIONES

1. Las pruebas de desarrollo o pérdida de color se pueden realizar en medios sólidos o líquidos.
2. Los cambios de viscosidad se pueden medir por comparación visual con un sustrato sin enzima o por medio de viscosímetros.

3. En la medición de zonas de hidrólisis se aconseja poner en el sustrato una sustancia cromogénica de manera que al efectuarse la hidrólisis aparezca una zona clara bien diferenciada.

4. Las técnicas descritas son solamente algunas de las que se pueden realizar en el laboratorio. Se deja al criterio del alumno, el uso de las mismas o el diseño de otras similares bajo la asesoría de su profesor de prácticas.

5. Para la realización de esta práctica en el tercer ciclo, el maestro proporcionará al alumno al menos 3 enzimas diferentes para que éste las identifique como: amilasa, invertasa, pectinasa, hemicelulasa, amiloglucosidasa, proteasa o lipasa, aplicando los métodos de identificación necesarios.

BIBLIOGRAFÍA

4, 8, 37, 53, 74, 17, 71, 91

PRÁCTICA No. 2: DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

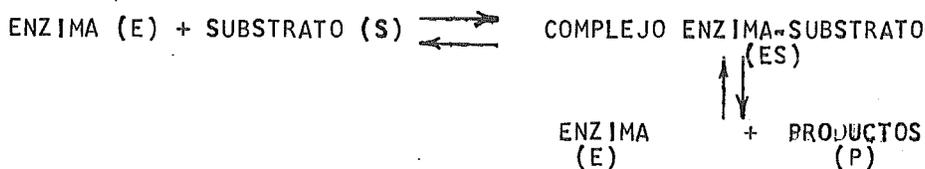
BASES TEÓRICAS

Las pruebas de actividad enzimática se basan en la medición de alguna transformación operada en el sustrato o de la formación de algún compuesto como producto de la reacción. Se deben investigar factores como pH, temperatura, concentración de enzima, nivel de humedad, presencia de inhibidores y/o activadores en el medio, presencia de radiaciones fuerza iónica y presión entre otros, para que la actividad enzimática se desarrolle en óptimas condiciones. (43,91)

La cinética enzimática estudia las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas. Es conveniente, tener conocimiento del tipo de reacciones que se desarrollan en -- procesos catalizados por ellas. Estos pueden ser:

1. REACCIONES SIMPLES

La reacción mas sencilla para un proceso catalizado por una enzima corresponde a:



2. REACCIONES DE ORDEN CERO

Las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas son de orden cero (con respecto al sustrato) cuando la enzima se encuentra saturada con el sustrato y la cantidad del producto formado por unidad de tiempo resulta dependiente de la concentración de la enzima.

$$(E_0) K = (P)/t = K_0$$

en donde K_0 (constante observada de la velocidad de reacción) es una constante que cambia con la concentración de la enzima mientras que K es una constante verdadera independiente de dicho valor. La velocidad de reacción de orden cero es independiente de la concentración del sustrato. Su fórmula general puede escribirse como sigue:

$$-\frac{dC}{dt} = K_0 = K_0 C^0$$

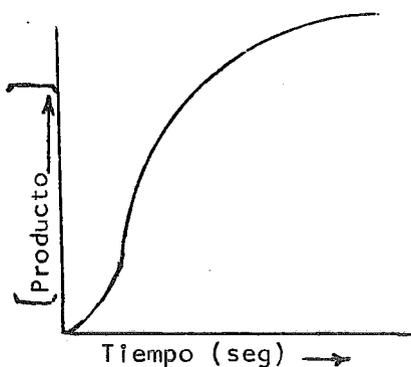
en la que C^0 es la concentración inicial que decrece con el tiempo. (20,35,51,57)

3. REACCIONES DE PRIMER ORDEN

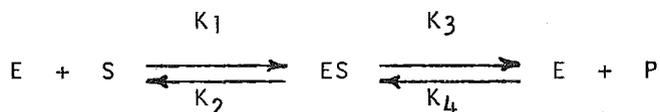
Las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas son de primer orden (con respecto al sustrato), cuando la enzima se encuentra saturada con el sustrato en proporciones menores al 5% y la velocidad de la reacción observada resulta dependiente de la concentración de enzima y sustrato.

$$(E_0) K = (2.3/t) \log (S_0)/(S) = K_0$$

En una gráfica del producto formado contra el tiempo de una reacción típica catalizada por enzimas, se obtendrá una curva semejante a la de la figura:



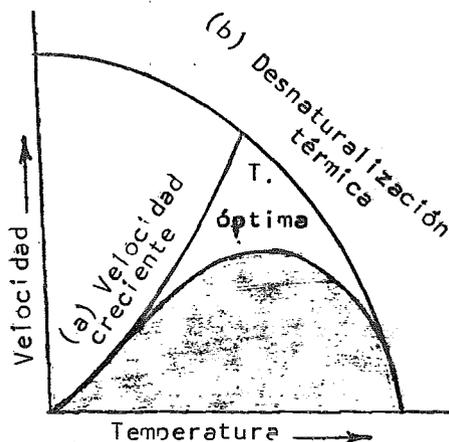
La primera parte, conocida con el nombre de estado preestable, corresponde a un período de tiempo corto en el que se equilibran las reacciones correspondientes a la ecuación general:



La segunda parte, corresponde a una reacción de orden cero, ya que la enzima se encuentra totalmente saturada con el sustrato.

La tercera parte, de velocidad decreciente, puede corresponder a una reacción de primer orden, ya que factiblemente su pérdida de velocidad se debe a que la enzima se encuentra cada vez menos saturada con el sustrato (20,35,51,91).

EFFECTO DE LA TEMPERATURA

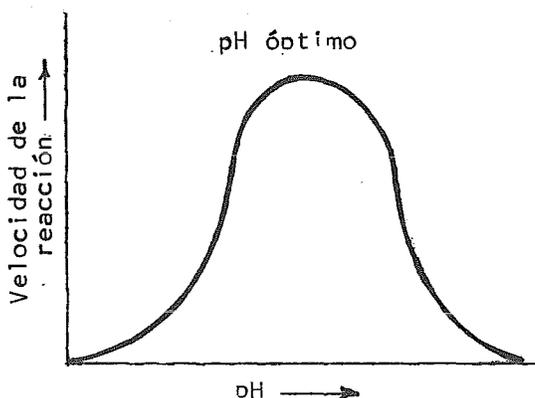


Las reacciones enzimáticas son sensibles a los cambios de temperatura. Sin embargo, debido a la naturaleza proteica de las enzimas, la desnaturalización térmica de éstas, causada por la elevación de la temperatura, hará que disminuya la concentración efectiva de ellas y por tanto la velocidad de la reacción. Hasta quizás unos 45°C el efecto predominante corresponderá a un incremento en la velocidad de la reacción. No obstante, arriba de esa temperatura, el factor de desnaturalización térmica adquirirá cada vez mas importancia hasta que, a unos 55°C , el proceso se acelera y destruye la función catalítica de la proteína enzimática. En la figura, (a) representa el aumento de la velocidad de la reacción como función de la temperatura; (b) representa la disminución en la velocidad de la reacción como una función de la desnaturalización térmica de la enzima (20).

EFFECTO DEL pH

Los cambios de pH afectan de manera notable el carácter iónico de los grupos amino y carboxílico de las enzimas, lo que modifica marcadamente el sitio catalítico y en general su conformación. Los cambios de pH además, pueden determinar una desnaturalización considerable que también conduce a la inactivación enzimática.

Como se puede observar en la figura, se obtiene una curva acampanada con un máximo relativamente estrecho y con pendientes decrecientes a ambos lados. La plataforma o estrato más elevado se llama pH óptimo. (20)



OBJETIVO

El alumno cuantificará la acción de la enzima sobre un substrato determinado.

FUNDAMENTO

Los métodos empleados para cuantificar la actividad de una enzima se basan en la medición de propiedades reológicas, desarrollo del color, volúmenes necesarios para realizar reacciones ácido-base, formación de precipitados, reacciones de óxido-reducción, cambios en el pH, rotación óptica y otros.

PROCEDIMIENTO

1. Determinar la actividad enzimática siguiendo el método de actividad enzimática apropiado al tipo de enzima del que se trate.

2. Reportar los resultados obtenidos para la curva patrón desarrollada, así como la actividad enzimática en cantidad de sustrato hidrolizado o de producto obtenido por unidad de enzima utilizada.

Una unidad de enzima es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de sustrato por minuto bajo condiciones de ensayo definidas (temperatura, pH, tipo de sustrato, etc). (20,78,91)

La Unidad de Actividad Enzimática (UAE) se define:

$$\text{UAE} = \text{micromoles de producto} / \text{minuto} / \text{mg de proteína}$$

La Actividad Específica (AE) está dada por la relación:

$$\text{AE} = \frac{\text{UAE} \times \text{ml}}{\text{mg proteína}}$$

La Potencia Enzimática (PE) es:

$$\bar{PE} = \text{UAE} / \text{ml} / \text{tiempo}$$

MÉTODOS DE ANÁLISIS

A. DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS

CARBOHIDRASAS

1. Disminución del color con iodo ^{*} (53) : Se fundamenta en la producción del color azul por medio del iodo en el enlace C-H de la estructura helicoidal de la amilosa.

2. Aparición de azúcares reductores: Las técnicas se basan en la determinación de azúcares reductores formados a partir de la hidrólisis del carbohidrato por acción enzimática. Existen varios métodos:

- Método de Bernfeld ^{*}: (9,19) Desarrollo del color frente al ácido 3,5 dinitrosalicílico en medio fuerte alcalino.

- Método de Nelson-Cooper ^{*}: (47,68,74) Medición espectrofotométrica de la reacción de grupos aldehídicos o cetónicos con el hidróxido de cobre en medio alcalino.

- Determinación de iodimetría ^{*}: (8) Se basa en la valoración de los grupos reductores mediante soluciones de iodo y la determinación del iodo mediante solución de tiosulfato de sodio.

- Método Volumétrico de Lane Eynon: Se fundamenta en la oxidación del grupo aldehídico dando lugar a la formación de un ácido y la reducción del Cu^{++} a Cu^+ en un medio bastante alcalino. (9)

- Método de Fehling^{*}: Se basa en la oxidación de la glucosa y la formación de óxido cuproso rojo insoluble. (71)

3. Cambio de la rotación óptica^{*}: Se basa en la disminución del poder óptico rotatorio a medida que transcurre la hidrólisis. (37)

En la actividad de carbohidrasas, la reacción de color con el iodo no da el número de enlaces rotos. De los métodos basados en la aparición de grupos reductores el mejor es el del ácido 3,5 dinitrosalicílico ya que relaciona la actividad específica con los equivalentes de reductores formados. Es independiente de la enzima utilizada, mientras que en los demás, el índice medido varía según la enzima utilizada. Los métodos volumétricos son los mas conocidos, siendo el de Fehling uno de ellos. Tienen la desventaja de que requieren mas tiempo para su realización. (91)

PROTEASAS:

1. Método volumétrico: Se basa en la estimación de los grupos amino y carboxílico liberados al efectuarse la hidrólisis de la proteína.

- Titulación carboxílica de Sörensen: Se fundamenta en el bloqueo de los grupos amino por la adición de formaldehído y la titulación de los grupos carboxílicos con hidróxido de sodio usando fenolftaleína como indicador. (4,9).

2. Métodos fotocolorimétricos: Se basan en la medición fotométrica de la intensidad del color desarrollado por la proteína cuando reacciona con reactivos especiales y en la comparación con soluciones patrones de concentración protéica conocida.

- Método de Biuret: Se basa en la disminución del color púrpura formado al tratar la proteína con Cu^{++} en medio alcalino desarrollándose un complejo tipo quelato. (9,74)

- Método de Lowry: Se fundamenta en la reducción de un reactivo de fosfomolibdato-tungstato por los restos de tirosina y triptofano presentes en un complejo cupro-alcalino para dar otro complejo de color azul-violáceo cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteína y puede medirse fotométricamente, a 660nm. (28,74)

3. Métodos espectrofotométricos: Se basan en la determinación de la concentración de proteínas en solución en base a la medición de la absorbancia a determinadas longitudes de onda por la presencia de enlaces peptídicos, presencia de aminoácidos bencénicos y otros. (280nm) (74).

4. Métodos electroforéticos:

- Método de la Ninhidrina: se basa en la separación por electroforesis de las proteínas o sus aminoácidos al reaccionar éstos con el nitrógeno terminal de ninhidrina y

formar compuestos coloridos, (9)

5. Oxidación del ácido crómico (91) : Se basa en el decremento de absorbancia a 440 nm, producida por el cambio de color (de amarillo a verde), del ácido crómico que se reduce a Cr_2O_3 .

Las proteínas se deben desnaturalizar si están en su forma nativa, empleando ácido o de preferencia urea 6M y después neutralizando para poder emplearlas como sustrato. Por lo general se emplea: caseína o hemoglobina-urea ácida desnaturalizada. En las determinaciones volumétricas los cambios de pH se pueden determinar por titulaciones o con el uso de un potenciómetro. En los primeros, se requieren alícuotas; en el caso del potenciómetro, el método es continuo y requiere menos tiempo. (91).

En las determinaciones fotocolorimétricas, el método de Lowry es el más sensitivo de todos; requiere de 10 a 40 microgramos de proteína; puede haber interferencia con grupos fenólicos cuando se trabaja con material vegetal. El método de Biuret necesita para su ejecución de 1 a 5 mg de proteína, es sencillo pero no da el número de enlaces rotos, en las lecturas a 290 nm. En la determinación de enlaces peptí-

dicos y aminoácidos, los métodos son bastante exactos y sensibles. El rango de proteína es de 100 microgramos por ml. Tiene la desventaja de que como determina aminoácidos aromáticos puede haber variación de una proteína a otra. Utilizando ninhidrina no es tan sensitivo y hay que tomar alícuotas. En la oxidación del ácido crómico pueden presentarse interferencias por la presencia de carbohidratos. La proteína sin hidrolizar se separa del medio de reacción empleando ácido tricloroacético (TCA). (91).

LIPASAS:

1. Método potenciométrico. (78): Se basa en la medición de la disminución del pH por la liberación del protón de los ácidos grasos producidos durante la hidrólisis.

2. Método de Sílica-Gel (53,78): Se basa en la extracción de los ácidos grasos libres en una columna de sílica gel y su titulación con álcali.

3. Método de reducción de la tensión superficial(78)
Se basa en la medida de la reducción de la tensión superficial por la liberación de los ácidos grasos libres debido a la lipólisis, la cual es relativa a la concentración de la enzima.

4. Método de Warburg: Se basa en la medición del CO_2 producido al reaccionar los ácidos grasos liberados en la lipólisis con bicarbonato de sodio. (78)

5. Método de turbidimetría: Se basa en la medición de la turbidez de una grasa emulsificada en función de la lipasa. (78)

6. Método fotométrico: Se basa en la estimación colorimétrica del producto coloreado producido por la acción del p-nitrofenilacetato en solución bajo la acción de la lipasa. (78)

De los métodos mencionados, los mas adecuados para el laboratorio son el de medición del pH potenciométricamente, siendo una determinación continua y sencilla de realizarse. La determinación colorimétrica es mas sensible. También se pueden utilizar las titulaciones con álcali.

B. DESARROLLO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS

1. Disminución del color con yodo: (AMILASA, AMILO-
*
GLUCOSIDASA). (53)

Reactivos:

- Solución de almidón al 2%
- Acido clorhídrico 0.1M

Solución de I-IK: 500 mg de yodo y 5 g de IK/100 ml. de agua.

El reactivo que se utiliza en la reacción se debe preparar unos minutos antes de utilizarse y consiste en disolver 1 ml. de la solución anterior en 100 ml. de agua destilada.

Técnica:

A 1 ml. del extracto enzimático agregarle 5 ml. de la solución de sustrato. Incubar por 10 min. a 25°C. Después de éste tiempo, se toma 1 ml. del digerido y se le agregan 5 ml. de ácido clorhídrico 0.1 M. Mezclar y tomar una alícuota de 1 ml. a la que se añaden 5 ml. de la solución de iodo recién preparada. La intensidad de color azul se mide en un espectrofotómetro a 660 nm. Realizar una curva patrón de maltosa de 0.2 a 1.0 mg/ ml.

Resultados:

Trazar una curva estándar (DENSIDAD ÓPTICA contra mg/ml de MALTOSA). Interpolar la lectura obtenida para el problema. Expresar el resultado en mg/ml de maltosa obtenidos por unidad de enzima utilizada.

* 2. Aparición de azúcares reductores: (CARBOHIDRATOS).

- Método de Bernfeld (9,19,27)

Reactivos:

- Ac. 3,5 dinitrosalicílico: Se disuelve a temperatura ambiente 1 g. de ácido 3,5 dinitrosalicílico en 20 ml.

NaOH 2N y 50 ml. de agua. Se agregan 30 g de tartrato doble de sodio y potasio y se aforan a 100 ml. con agua destilada (esta solución debe protegerse del CO_2).

- Sustratos:

Solución de almidón al 2% pH 5 (para amilasa)

Solución de pectina al 1% pH 4 (para pectinasa)

Solución de sacarosa: 10% pH 4.6 (para invertasa)

Solución de CMC al 1% pH 4.5 (para celulasa)

- Solución Buffer de acetatos 0.02M pH: 4, 4.5, 4.6, 5.

Procedimiento:

Adicionar a varios tubos 1 ml. del buffer de acetato adecuado a la enzima analizada. Agregar el extracto enzimático (1 mg/10 ml. ó 0.1 ml/10 ml) a cada tubo, teniendo en cuenta que la reacción enzimática debe durar 3 min. Agregar a cada tubo un volumen de agua destilada tal, que la cantidad final sea de 5 ml. Añadir 2.5 ml. de sustrato. Incubar los tubos a 25°C. Después de 3 min. se adicionan 2 ml. del reactivo de Bernfeld (DNS). Hervir durante 5 min. Enfriar y leer en espectrofotómetro a 540nm. El blanco se elabora adicionando todos los reactivos excepto el extracto enzimático y tratándose igual que los demás tubos. Preparar una curva patrón que debe contener de 0.1-1mg/ml de glucosa. Colocar la muestra (1 ml) y 3 ml. del reactivo de Bernfeld en baño maría a ebullición por 5 min. Enfriar y leer en espectrofotómetro a 540 nm. con un blanco de agua destilada.

Resultados:

Trazar una curva estándar (DENSIDAD OPTICA contra mg/ ml de glucosa) Interpolar la lectura obtenida para el problema. Expresar el resultado en mg/ml de glucosa obtenidos por unidad de enzima utilizada. Tomar en cuenta el PM del producto obtenido y relacionarlo con el de la glucosa.

- Método de Nelson Cooper* (47,68)

Reactivos:

- Solución A: disolver 25 g de carbonato de sodio anhidro, 25 g de tartrato doble de sodio y potasio, 20 g de bicarbonato de sodio y 200 mg de sulfato de sodio anhidro en 800 ml. de agua. Agregar las sales poco a poco y agitar. Diluir a 1 lt. Filtrar si es necesario.

- Solución B: 30 g de sulfato cúprico se disuelven en 200 ml. de agua a la que previamente se le ha agregado 4 gotas de ácido sulfúrico.

- Solución C: 25 g de molibdato de amonio se disuelven en 450 ml de agua a la que se le agregó previamente 21 ml de ácido sulfúrico concentrado, 3 g de arseniato de sodio heptahidratado se disuelven separadamente en 25 ml de agua y se agregan lentamente a la solución anterior con agitación constante. Todo se diluye a 500 ml y se calienta cuidadosamente por 30 min. en un Baño María a 55°C y 37°C durante toda la noche.

- Solución D: 1 ml de B + 25 ml de A.

- Sustratos:

Se emplean los mismos sustratos que para el método de Bernfeld.

Técnica:

1 ml. de la solución de enzima debidamente diluida se añade a 1 ml. de sustrato. Después de 10 min. de incubación a 25°C, una parte del digerido (1 ml) se añade a 1 ml de la solución D recientemente preparada. Se añora a un volúmen de 4 ml. con agua destilada. Se incuba a Baño María en ebullición durante 20 min. Enfriar durante 5 min. en agua corriente 1 ml. del reactivo C es añadido y se agita energicamente el tubo. Se dejan reposar los tubos por espacio de 10 minutos y se diluyen a 25 ml. con agua destilada. La absorbancia se mide en un colorímetro con un filtro verde a una longitud de onda de 520 nm. Preparar una curva patrón similar a la del método de Bernfeld.

Resultados:

Trazar una curva estándar (DENSIDAD ÓPTICA contra -- mg/ml de GLUCOSA). Interpolar la lectura obtenida para el problema. Expresar el resultado en mg/ ml de glucosa obtenida por unidad de enzima utilizada. Tomar en cuenta el PM del producto y relacionarlo con el de la glucosa.

*

Determinación iodimétrica (8)

Reactivos:

- Solución Buffer de acetatos 0.2 M pH: 4, 4.5, 4.6, 6.5
- Solución de I-KI (0.02N de Iodo): Disolver 1.27 g de Iodo sublimado y 2 g de IK en 3 ml. de agua y aforar a 500 ml. con agua destilada. Almacenar en frasco ambar y verificar la concentración con una solución de tiosulfato.
- Solución de carbonato de sodio 0.1N
- Solución de ácido sulfúrico al 10%
- Solución de tiosulfato de sodio 0.01N
- Solución indicadora de almidón: Disolver 1 g de almidón soluble y 5 mg de ioduro de mercurio haciendo una pasta con una pequeña cantidad de agua. Añadir 500 ml. de agua destilada manteniéndola a ebullición por 5 min. enfriar.

Sustratos:

Se emplean los mismos sustratos que para el método de Bernfeld.

Técnica:

Pipetear sucesivamente en un erlenmeyer 50 ml. de solución de sustrato, 40 ml. de agua destilada, 5 ml. de buffer incubar a 30°C y agregar 5 ml. de la enzima. Tomar el tiempo (con una baja actividad enzimática úsese más cantidad del problema y menos agua, manteniendo el mismo volumen). Después de 30, 60, 90 y 120 min. de incubación, tomar 20 ml. del problema y determinar iodimétricamente, agregando 25 ml. de so --

lución de iodo, 20 ml. de solución de carbonato de sodio. Almacenar en la oscuridad durante 0.5 a 1 hora y añadir 5 ml. de la solución al 10% de ácido sulfúrico. 3 gotas de solución indicadora de almidón. Titular con tiosulfato de sodio.

Resultados:

La diferencia de ml. de tiosulfato consumidos se utiliza para los cálculos:

1 ml. de la solución 0.1N de tiosulfato corresponden a 1 ml. de la solución de glucosa 0.005M o 0.9005 mg de glucosa o 1.7115 mg de sacarosa hidrolizada. La cantidad de azúcar hidrolizada en g/100 ml. se calcula por:

$$\Delta C = 5 (\Delta V) (1.7115 \times 10^{-3}) = 8.5575 \times 10^{-3} (\Delta V)$$

ΔV = diferencia de ml. de tiosulfato consumido.

3. Cambio de la rotación óptica: ^{*} (INVERTASA)(8)

Reactivos:

- Solución de sacarosa 0.3M
- Buffer de acetatos 0.2M pH 4.6

Técnica:

Pipetear en un erlenmeyer 50 ml. de solución de sacarosa, 40 ml. de agua destilada, 5 ml. de buffer de acetatos. Incubar a 30 °C y agregar 5 ml. del problema. Tomar el tiempo. Después de 30,60,90 y 120 min de incubación, tomar 20 ml. del problema y enfriarlos a 20°C. Determinar la rotación óptica en un tubo de 20 cm. con un polarímetro. Clarificar la turbidez de la solución debida a las proteínas que

contiene por la adición de solución de acetato de plomo antes de la lectura. La rotación específica $(\alpha)_D^{20}$ de sacarosa es de +66,45 grados y la del azúcar invertido es de - 20,59 grados en una solución al 10%. De esto se deduce que la cantidad de azúcar hidrolizada (ΔC) en g/ 100 ml. a 20°C para una concentración inicial de azúcar de 5% es:

$$\Delta C + 0.57 \left([\alpha_s]_D^{20} - 1.05 [\alpha_i]_D^{20} \right)$$

donde $[\alpha_s]_D^{20}$ y $[\alpha_i]_D^{20}$ son las rotaciones ópticas antes y después de la incubación con invertasa. (8)

4. Método volumétrico. (PROTEASAS)

- Titulación carboxílica de Sørensen. (4,9,24,39,50)

Reactivos:

- Caseína al 1%
- Formol al 40%
- Indicador de fenolftaleína
- NaOH 0.1N

Técnica:

Se mezclan 10 ml. de solución de caseína al 1% con 1 ml. de solución conteniendo la enzima en un tubo de ensayo. También se coloca otra muestra sin solución de enzima utilizada como patrón. Se incuban las muestras a 37°C durante 30 min. Se adiciona al tubo marcado como patrón un ml. de la solución de enzima. Se coloca en el baño maría a

ebullición, se colocan las muestras durante 2 min. con objeto de inactivar la enzima, enfriando posteriormente. Se neutraliza el formol, adicionando 3 gotas de fenolftaleína y añadiendo NaOH 0.1N hasta el vire a color rosa.

Las muestras se pasan a matraces erlenmeyer previamente rotulados y se colocan 20 ml. de formol neutralizados a cada uno de los matraces. Se agita y se deja reposar varias veces durante 10 min. procediendo a titular las mezclas con NaOH 0.1N hasta el vire a color rosa persistente.

Resultados:

Los ml. de NaOH 0.1N valorados se restan a los encontrados en la muestra patrón. La diferencia es el álcali gastado en la titulación. Se debe tomar en cuenta que cada ml de NaOH 0.1N equivalente a 7 mg Nitrógeno de aminoácidos, de donde se puede inferir la actividad proteolítica de la enzima.

5. Métodos fotocolorimétricos (PROTEASAS)

*

- Método de Lowry. (26,28,50,58)

Reactivos:

- Solución de caseína: 1 g de caseína se coloca en un matras que contenga previamente 5 ml. de agua. Agitar hasta formar una suspensión. Añadir 10 ml. de NaOH 0.1N agitar

y añadir 50 ml. de agua. Volver a agitar hasta la disolución total de la caseína. Esta solución debe tener un pH de 8. Se transfiere esta solución en forma cuantitativa a un matr^áz y o lumétrico de 100 ml. Diluir hasta el volumen con agua y mezclar perfectamente. Este sustrato deberá emplearse solamente el día en que se prepare.

- Solución de ácido tricloroacético al 30%

- Reactivo de fenol (folin-Ciocalteu): En dos volúmenes de agua destilada diluya un volumen del reactivo de fenol.

- Solución de enzima: (0.1 ml ó 1 mg/ 10 ml. buffer).

Técnica:

Se colocan 5 ml. de la solución de caseína en un matr^áz colocándose en un baño de temperatura constante a 40°C manteniéndose tapado. Dejar durante 15 min. para que se estabilice la temperatura. Sin sacar el matr^áz del baño adicionar 1 ml. de la solución de enzima tomando el tiempo. Tapar el matr^áz, agitar y mantener en el baño durante 30 min. Adicionar posteriormente 3 ml. de la solución de ácido tricloroacético, agitar el matr^áz, sacarlo del baño y filtrar la solución. El testigo se prepara colocando 1 ml. de la solución enzimática y 3 ml. de la solución de ácido tricloroacético, con 5 ml. de la solución sustrato. Se agita y se filtra desarrollándose el color en el testigo y la muestra problema colocando 2 ml. del filtrado correspondiente en una cubeta del fotocolorímetro. Adicionar 3 ml. de NaOH 1N y 1 ml. de la solución de

fenol. Esta operación debe hacerse simultáneamente para la muestra y el testigo. 5 min. después, leer a 640 nm en un fotocolorímetro empleando el testigo (tubo sin enzima) para ajustar el instrumento.

Resultados :

Realizar una curva estándar utilizando una solución patrón de albúmina de suero bovino que contenga 320 g/ml de la misma manera que la seguida para el problema.

Los valores del problema se extrapolan a la curva patrón, reportándose los datos de actividad enzimática en cantidad de producto obtenido por unidad de enzima utilizada.

6. Métodos espectrofotométricos (PROTEASAS) (58)

Sustratos:

El sustrato utilizado de caseína se prepara de la misma manera que para el método de Lowry.

Reactivos:

- Solución Buffer de fosfatos pH 7.5
- Solución de ácido tricloroacético (TCA) 50g/lit
- Solución de enzima (0.1 mg/10 ml de buffer)

Técnica:

Colocar en dos tubos marcados, 2 ml. de la solución buffer respectivamente y 1 ml. de la solución de enzima a uno de los tubos. Coloque los tubos en un baño a 40°C. Añadir 2 ml. del sustrato de caseína a ambos tubos, mezclar. Después de 60 min. de la adición del sustrato, detener la reacción adi

cionando 5 ml. de solución de TCA. Agitar, extraer los tubos del baño. Mantener 10 min. a temperatura ambiente para la precipitación completa de la proteína. Filtrar. El filtrado deberá estar exento de turbidez. Determinar la absorbancia de los filtrados a 280 nm. en un espectrofotómetro empleando el filtrado del testigo (tubo sin enzima) para ajustar el instrumento.

Resultados:

Se puede trabajar con una enzima de actividad conocida para calcular el valor del problema o trabajar con una curva patrón de suero de albúmina de la misma manera que para el método anterior extrapolando los valores en la curva patrón, y reportando los resultados de actividad en cantidad de producto por unidad de enzima utilizada.

*

7. Método Potenciométrico. (LIPASAS) (National Formulary)

Reactivos:

- Solución de acacia al 10%
- Sustrato de aceite de olivo: 165 ml. de solución de acacia, 20 ml. de aceite de olivo y 15 g de hielo molido mezclar en un vaso de licuadora. Enfriar a 5 °C en baño de hielo. Homogeneizar a elevada velocidad durante 15 min. Enfriar intermitentemente en un baño de hielo para evitar que la temperatura se eleve a más de 30°C.
- Solución buffer: 60 mg de Tris-hidroximetilamino-metano y 234 mg de cloruro de sodio en cantidad suficiente de agua para alcanzar 100 ml. de volumen total. Disuélvase las

sustancias por separado.

- Solución de taurocolato de sodio: 80mg/ml.

- Solución de enzima: (0.1 ml. ó 1 mg. / ml). Para una mejor disolución y actividad de la enzima, molerla en un mortero y mantener a 4°C mezclándose antes de usarse.

Técnica:

Mezclar 10 ml. del sustrato de aceite de olivo, 8 ml. de la solución buffer, 20 ml. de la solución de taurocolato de sodio y 9 ml. de agua en un recipiente de vidrio y colocar en un baño a temperatura constante. Agitar y mantener la temperatura a 37°C. Añadir la solución de NaOH 0.1N empleando una microbureta. Ajustar el pH a 9.2 potenciométricamente. Añadir 1 ml. de la solución de enzima y continuar agregando la solución de NaOH 0.1N durante 5 min. de manera que el pH permanezca en 9. Determinar el volúmen de solución de NaOH 0.1N que se añadió después de cada minuto.

Resultados:

Graficar el volúmen de la solución de NaOH titulador contra el tiempo. Calcular la acidéz promedio liberada por minuto de la muestra. Comparar el valor contra un testigo de actividad conocida.

8. Método fotométrico:(LIPASAS) (19).

Reactivos:

- Sustrato de p-nitrofenolacetato (PNPA).
- Buffer de fosfatos M/15 pH 7.

- Solución de NaOH 0.1 N

- Solución estándar de p-nitrofenol. Series de soluciones preparadas conteniendo 0.1 a 0.7 micromoles de p-nitrofenol por mililitro.

Técnica:

63 mg de PNPA son disueltos en 10 ml. de metanol y almacenados en refrigeración. 1 ml. de esta solución es lentamente añadida a 100 ml. de agua destilada con agitación fuerte para prevenir precipitaciones. Esta solución se prepara al día y puede usarse para determinaciones de actividad cualitativas o semicualitativas.

Para la determinación de la actividad, 1 ml. de solución de enzima es mezclada con 2 ml. de buffer de fosfatos y 5 ml. de agua destilada directamente en el tubo del colorímetro. El tubo es llevado a 25°C en un baño de agua. 1 ml. del sustrato se añade. Colocar el tubo en el colorímetro y el galvanómetro se pone a 100. Después de 20 min. se coloca el galvanómetro en el mismo lugar de la lectura primera y se obtiene la lectura final.

Resultados:

De la curva patrón de p-nitrofenol la cantidad de p-nitrofenol liberado en la muestra es extrapolado y el valor resultante es multiplicado por el factor de dilución de la preparación de enzima. La cantidad de enzima que libera un micromol de p-nitrofenol es una unidad de actividad estearasa.

9. Método de titulación usando sustratos solubles en agua: (LIPASAS), (19)

Reactivos:

- Tween 20
- Acetato de sodio 0.2 N
- Solución acuosa de rojo de fenilo 0.02%
- NaOH 0.02N
- Alcohol decílico
- Solución de enzima (0.1 ml o 1 mg/ 10 ml)

Técnica:

El sustrato es preparado mezclando 100 ml de buffer con 50 ml. de Tween, 10 ml. de indicador y 90 ml. de agua des^utilada. El pH de la mezcla es cerca de 7.2. A 1 ml. de la pre^uparación de enzima se añaden 5 ml. de sustrato. Se tapa el tu^ubo prueba y se coloca en baño a 20°C. 9 min. después debe a^uñadirse 1 gota de alcohol decílico para prevenir la espuma. La solución es titulada . El valor del testigo es obtenido por titulación bajo idénticas condiciones titulando separada^umente 5 ml. de sustrato y 1 ml. de enzima.

Resultados:

La diferencia entre el álcali consumido en la prueba problema y la suma de los dos testigos es dada como la medida de la actividad enzimática. Por definición 1ml de NaOH 0.02N corresponde a 100 unidades de lipasa. El indicador es amarillo al principio y su transición de rosa a rojo violeta indica el punto final (pH 8.3)

CUESTIONARIO

1. ¿A que se llama actividad y potencia enzimática?
2. Escriba y explique las reacciones de los métodos de Bernfeld, Nelson Cooper, Lane Eynon, Fehling y Lowry.
3. ¿En que se basa el método de Sørensen?
4. ¿Que importancia tiene la medición de actividad amilolítica, proteolítica y lipásica en productos como el pan?
5. ¿ Por qué se podría utilizar la invertasa y pectinasa como índice de madurez en frutas y vegetales?

OBSERVACIONES

1. Al realizar curvas patrón se debe calcular la concentración de enzima para que el desarrollo del color entre en los valores de la misma. En caso de no ser así, se pueden realizar diluciones de ambas, para poder leer en el colorímetro.
2. Antes de empezar cualquier técnica, comprobar que se dispone de las sustancias, soluciones y equipo necesarios para efectuar la prueba y realizar las mezclas de soluciones momentos antes de la misma, en caso de que deba hacerse.
3. Realizar diagramas claros de los pasos a seguir en los métodos, para evitar confusiones.

BIBLIOGRAFIA

4,8,9,11,13,14,16,17,19,24,27,28,31,37,39,45,46,50,53,54,58,64,65,68,71,74,79,91.

PRÁCTICA No. 3: ACTIVACIÓN E INHIBICIÓN ENZIMÁTICA.

BASES TEÓRICAS

Desde el punto de vista de la cinética de las reacciones se puede considerar que existen dos tipos de inhibidores: los REVERSIBLES y los IRREVERSIBLES. El grupo de inhibidores irreversibles incluye todos los compuestos que reaccionan con una enzima para formar enlaces covalentes estables. Los inhibidores reversibles pueden dividirse en : COMPETITIVOS y NO COMPETITIVOS.

La inhibición competitiva es caracterizada porque -- depende de la concentración del sustrato, la concentración del inhibidor y la K_m del complejo enzima-sustrato y enzima-inhibidor. La inhibición es producida por la competencia con el sustrato por la unión con el sitio activo de la enzima. Es to implica una similitud en la estructura del inhibidor y del sustrato.

Un inhibidor competitivo puede ser reversible por el incremento de la concentración del sustrato.

Los inhibidores no competitivos producen una inhibición que no puede revertirse aumentando la concentración del sustrato, ya que no existe una competencia entre el inhibidor y la afinidad de éste por la enzima.

En la inhibición no competitiva, el inhibidor puede unirse a la enzima tanto en el sitio en que lo hace el sustrato como en otro diferente. Cuando ésta unión se establece en alguna parte de la molécula enzimática que no está lo suficientemente cerca del sitio en que se une el sustrato con la enzima, la pérdida de la actividad catalítica puede ser el resultado de un cambio conformacional propiciado por la adición del inhibidor.

Un inhibidor puede reaccionar directamente con grupos esenciales del sitio activo de la enzima, con grupos específicos de la enzima que no involucren el sitio activo pero que son importantes para mantener la conformación de éste o junto a importantes multisubunidades enzimáticas.

El sitio activo de la enzima que es el punto en el que se realiza la captura del sustrato y el lugar donde se lleva a cabo la catálisis enzimática, es de suma importancia.

La teoría de Koshland de AJUSTE INDUCIDO postula:

1. Durante la unión del sustrato y la enzima en el sitio activo, se determina un cambio considerable en la geometría de la proteína enzimática.
2. Para que se produzca la catálisis es indispensable que el sustrato esté orientado en forma muy precisa.
3. Dicha orientación es inducida por el propio sustrato mediante el cambio a que da lugar en la geometría

del sitio activo de la enzima.

Activación enzimática.

Las enzimas frecuentemente requieren de cofactores para efectuar sus funciones catalíticas. La activación de las enzimas se logra por medio de: coenzimas, grupos prostéticos, iones metálicos y grupos reductores.

Una coenzima es una molécula orgánica que participa en la reacción, adhiriéndose a la enzima, con lo cual hace que ésta se active. En algunos casos los cofactores enzimáticos están firmemente unidos a la molécula y reciben el nombre de grupos prostéticos. Los grupos hemes, flavin, y biotina corresponden a éste tipo de cofactores.

Mientras que la actividad de algunas enzimas no es afectada por la presencia o ausencia de sales, otras son bastante influenciadas por la naturaleza y concentración de los iones presentes. Algunos iones son absolutamente necesarios para la actividad de algunas enzimas, mientras que otros son altamente tóxicos para casi todas ellas, Ej: Ag^+ , Hg^{++} y Pb^{++} . Los efectos que los iones producen en las enzimas pueden ser diferentes y en algunos casos no son correctamente aclarados. (20, 25, 43, 51, 61, 78, 89, 91,).

ALGUNOS INHIBIDORES ENZIMÁTICOS (92)

<u>INHIBIDOR</u>	<u>GRUPO DE LA ENZIMA</u>	<u>INHIBIDOR</u>	<u>GRUPO DE LA ENZIMA</u>
ión cianuro	Fe ⁺³ Cu Zn y otros metales	o-fenantrolina	Fe Co Zn y otros metales
ión sulfuro	varios metales	ión fluoruro	Mg Ca otros
ión oxalato	Mg Ca	CO	Fe ⁺² Cu
ión dietil dietiocarbamato	Cu	ión EDTA	varios iones metálicos
ión pirofosfato	Mg Mn Zn y otros metales	iodoacetamida	grupo sulfhidrilo
ión azida	Fe ⁺³ protoporfirínico	N-etilmaleimida	grupo sulfhidrilo
ión p-mercuribenzoato	grupo sulfhidrilo	varios arsenicales	grupo sulfhidrilo
radical alfa-alfadipiridito	Fe	ión diisopropilfosfofluoridato	grupo OH de la serina
cisteína y sulfhidrilo	Fe Cu otros también puede reducir	metales pesados Ag Hg ₂ Pb ₂	grupo sulfhidrilo posible pp. protéica

ALGUNOS ACTIVADORES ENZIMÁTICOS (78)

<u>ACTIVADOR</u>	<u>ENZIMA</u>	<u>ACTIVADOR</u>	<u>ENZIMA</u>
reductores cisteína glutatiòn bisulfito de Na.	gpo. SH en sitio activo (papaina, ficina, bromelina)	NaCl Co ⁺⁺ Ni ⁺⁺ Pb ⁺⁺ Zn ⁺⁺	lipasa pancreática carboxipeptidasa
Na ⁺ Ca ⁺	pectinmetilesterasas	Cu	oxidasas con metal en sitio activo
Zn ⁺⁺	proteasas neutras de B. subtilis	Ca ⁺⁺	estabilizantes de alfa amilasa bacteriana.

OBJETIVO

El alumno comparará cualitativamente el efecto que tienen los activadores e inhibidores en la acción de una enzima sobre un sustrato.

FUNDAMENTO

La acción de una enzima sobre un sustrato puede ser disminuida o suprimida completamente de varias formas: inhibición e inactivación. La inhibición es la supresión parcial de la actividad mediante un proceso que no se encamina a la destrucción de la enzima. Los productos finales de la reacción pueden actuar como inhibidores. La inactivación, es mas amplia puede ser parcial o total. Cualquier sustancia que acreciente la actividad enzimática es un activador (43).

Las enzimas tienen diferentes límites de acidéz o alcalinidad fuera de los cuales ocurre la desnaturalización.

PROCEDIMIENTO

En ésta práctica se harán 3 series (A,B,C) de soluciones de la enzima a analizar, manteniendolas en las condiciones adecuadas a la misma. A la serie A se le añadirán activadores, a la Serie B se le añadirán inhibidores y la serie C se mantendrá como testigo. Se permitirá que las tres series reaccionen con el sustrato apropiado a la enzima a temperatura pH y demás condiciones óptimas, determinándose posteriormente la actividad.

La determinación de la acción de activadores e inhibidores enzimáticos se puede realizar por métodos cualitativos y cuantitativos similares a los empleados en las prácticas 1 y 2.

La ventaja de los métodos cualitativos es el ahorro de tiempo mientras que la de los métodos cuantitativos es la exactitud de los resultados. En la industria se utilizan ambos métodos dependiendo de la importancia de los factores tiempo y exactitud. En el laboratorio de Enzimología el empleo de uno u otro método dependerá del tiempo disponible en el semestre.

CUESTIONARIO.

1. Mencionar cuales son las sustancias que inhiben a las amilasas, las sulfhidril proteasas, las proteasas ácidas y las lipasas.

2. ¿Cuáles son los inhibidores y activadores permitidos en alimentos?

3. Además del uso de sustancias químicas, ¿Qué otros métodos existen para inhibir y activar la acción de enzimas en la industria alimentaria?

4. ¿Cuales son los factores que intervienen para que se produzca la activación e inhibición enzimática? Menciónelos y explique de qué manera actúan.

5. ¿Qué función desarrolla el Ca^{++} en la amilasa?

6. En base al sitio activo que presentan, ¿Cuáles son las sustancias que activan e inhiben las metaloproteasas y por qué?

7. ¿Por qué algunos alimentos como frutas y verduras se conservan mejor en refrigeración?

8. Dé 4 ejemplos de ventajas logradas al activar o inhibir enzimas presentes en alimentos.

OBSERVACIONES

1. Al realizar las pruebas seleccionadas para determinar la acción de activadores e inhibidores, tomar en cuenta los pH, temperaturas, concentraciones y demás factores que afectan las mismas.

2. En caso de que se efectúen pruebas cualitativas se sugiere utilizar las mismas cantidades de enzima, sustrato y cantidad de sustancia a probar para tener un índice de confiabilidad aceptable en la prueba, y poder determinar qué sustancia activa o inhibe en mayor grado a la enzima analizada.

3. Realizar las pruebas contra un blanco de enzima y sustrato en condiciones óptimas para poder hacer comparación de los resultados que se obtengan.

BIBLIOGRAFÍA

8, 19, 25, 26, 28, 38, 39, 50, 72, 74, 78, 89, 91.

BASES TEÓRICAS.

En el proceso de obtención de enzimas, el primer paso es la selección de la fuente a utilizar. Una vez que se ha decidido la fuente de enzimas a emplear, el siguiente paso es extraer la enzima y proceder a su purificación.

En caso de que la enzima sea intracelular, se procede a la ruptura de las células y membranas, la cual se puede efectuar mediante un homogenizador; con solventes orgánicos como acetona en el caso de preparaciones vegetales; usando vibración de sonido (SONICADOR); por medio de la fuerza que las células dan al tratar de pasar a través de un pequeño orificio con alta presión, entre otros. Cuando las enzimas son intracelulares, se debe tener la precaución de analizarlas antes de que se rompa la pared celular.

Las enzimas se pueden extraer en base a su solubilidad, densidad y distribución de carga, tamaño y forma, estabilidad y otros.

La separación de proteínas en base a sus diferentes solubilidades, es un método clásico. La solubilidad de una proteína es determinada por los siguientes factores:

A. Densidad de carga y distribución de carga.

Se determina por el número de residuos de aminoácidos ácidos o básicos dados por residuos de ácido aspártico, glutámico, histidina, lisina, arginina al igual que los grupos amino y carboxílico de los finales de las cadenas polipeptídicas. Debido a su naturaleza hidrofílica están orientados generalmente en la parte exterior de la molécula proteínica al ser expuestos en una fase acuosa. La densidad de carga de una proteína puede estar afectada por el cambio de pH. La precipitación de una proteína en el punto de mínima solubilidad depende de su concentración y solubilidad en éste punto. Muchas proteínas son precipitadas ajustando el pH, (por ejemplo: la caseína de la leche).

El decremento en la constante dieléctrica del medio puede aumentar la fuerza atractiva. Por esta razón se utiliza acetona o alcohol para precipitar proteínas.

En la precipitación de proteínas por medio de solventes orgánicos es importante controlar el pH al igual que la cantidad de iones inorgánicos presentes.

Para controlar la desnaturalización de proteínas - por medio de la ruptura del enlace hidrofóbico, la precipitación con solventes orgánicos debe ser hecha a bajas temperaturas.

B. Control de hidratación. (SALTING OUT)

El grado de hidratación puede ser cambiado variando el pH. El cambio usual para disminuir el grado de hidratación es añadiendo compuestos que rompan el agua de hidratación que está alrededor de la proteína. Los compuestos mas usados son sulfato de amonio, cloruro de sodio, sulfato de sodio y cloruro de magnesio. El sulfato de amonio es el mas usado debido a su alta solubilidad en agua. Las sales univalentes, aunque son poco solubles, son relativamente inefectivas en la precipitación de enzimas, comparadas con las sales polivalentes. El efecto de sales en la solubilidad varía de una a otra y es diferente para cada proteína.

Los factores de temperatura, pH, naturaleza de la proteína, naturaleza de la sal y otros son determinantes en la precipitación de enzimas.

En la purificación de proteínas por precipitación es necesario establecer la concentración de sales a usar bajo las condiciones específicas de cada experimento. Usualmente se puede reproducir el pH, la temperatura de la solución, pero la concentración exacta de proteína en la mezcla es mas difícil de reproducir.

Una proteína pura no se obtiene por precipitación - debido a que todas las moléculas no se precipitan en la misma concentración de sal y se enmascaran en la solución con otras proteínas.

Las proteínas son precipitadas por metales pesados en forma iónica (Pb^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Ca^{+2}) y por materiales po

iónicos. Los iones metálicos probablemente funcionan para precipitar proteínas por neutralización de las cargas de las proteínas.

Los ácidos nucleicos y las protaminas precipitan proteínas por interacción electrostática causando reducción neta de la carga de la proteína y agregados de forma poliónica.
(62,91)

C. Presencia de componentes no protéicos.

La solubilidad de una proteína es también determinada por la cantidad con que se hidrata la molécula. Los grupos mas cargados de la molécula de proteína son en general los mas hidratados. La presencia de otros aminoácidos afecta también el grado de hidratación. Los grupos fosfato, sulfato y carbohidrato incrementan mientras los lípidos disminuyen el grado de hidratación.

OBJETIVOS

1. El alumno interpretará la acción de sustancias precipitantes sobre diferentes enzimas.
2. El alumno seleccionará la substancia que precipite en mayor grado a una enzima determinada, sin alterar sus propiedades.

FUNDAMENTO

La práctica se basa en la acción de diferentes factores (substancias orgánicas e inorgánicas, temperatura, pH, diferencias de concentración de los precipitantes y solución de enzimas, etc), en la diferencia de solubilidades de las mezclas de enzima, los cuales, manejados de manera apropiada, ayudan a precipitar de una forma efectiva a las enzimas.

PROCEDIMIENTO

En ésta práctica se prepararán al menos, dos series de soluciones de enzima en las condiciones adecuadas al método elegido. A una de las series se le añadirán substancias orgánicas mientras que a la otra se le adicionarán sustancias inorgánicas. Se tendrán varios tubos como testigo a los que solamente se les agregará la solución de enzima a precipitar.

Para poder comparar los resultados se deben mantener constantes las cantidades de enzima y de precipitantes agregados, de manera que se pueda filtrar y pesar el precipitado obtenido con cada uno de los reactivos y se determine el que actuó precipitando una mayor cantidad de proteína.

El parámetro de comparación para evaluar el rendimiento de la precipitación y determinar si la enzima ha sido desnaturalizada en el proceso de precipitación, será la prueba de actividad enzimática que se verifique en la enzima que ha sido precipitada.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

A. DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS

1. Ajuste del pH: se basa en que la precipitación de una enzima en su punto de mínima solubilidad depende de su concentración y solubilidad en ése punto. Una práctica usual es empleando un pH en, o cercano al, punto de mínima solubilidad. La precipitación de caseína de la leche ajustando el pH entre 4 y 5 podría ilustrar éste tipo de pruebas. Para tener un precipitado de proteínas, varias moléculas de ésta pueden formar un agregado en el cual se combinen sus solubilidades (debido al tamaño de la masa y a la unión de los grupos cargados), siendo menos que la solubilidad de la molécula individual. (91).

2. Alteración del grado de hidratación (SALTING OUT): se basa en la adición de compuestos que rompen el agua de hidratación que está alrededor de la proteína. Por lo general, los grupos fosfato, sulfato y carbohidrato incrementan el grado de hidratación, mientras los lípidos lo disminuyen. Se utilizan: NH_4SO_4 , NaCl , Na_2SO_4 , MgCl_2 , etc. (91).

3. Adición de solventes orgánicos: para minimizar la desnaturalización de proteínas por medio de la ruptura

de enlaces hidrofóbicos, la precipitación con solventes orgánicos debe ser hecha a bajas temperaturas. (91).

4. Precipitación con metales pesados: Las proteínas se precipitan por metales pesados en forma iónica (Pb^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2}), y por materiales poliónicos. Todas las proteínas son precipitadas a altas concentraciones de iones de metales pesados pero ciertas proteínas son precipitadas a bajos niveles. Por ejemplo: la caseína es mucho menos soluble en presencia de Ca^{+2} , la enolasa y la papaína pueden ser cristalizadas con derivados de Hg^{+2} . Estos iones probablemente funcionan para precipitar proteínas por neutralización de las cargas de las proteínas y/o por la formación de uniones entre las moléculas de proteínas. (91).

5. Adición de las sales inorgánicas como precipitadores de impurezas: Se basa en la formación de un precipitado IN SITU que arrastra las células bacteriales usadas en la fermentación y otros contaminantes. Puede ser realizada en dos etapas. (63).

6. Adición de cationes: Se emplea para enzimas fungales. Utiliza un catión del 2do (Ba, Ca, Sr, Cd, Pb, Mg) para tratar el líquido obtenido de los cultivos de microorganismos. Se eliminan los contaminantes presentes en el líquido sin efecto adverso sobre las enzimas. Se pueden eliminar los ácidos orgánicos, ácido glucónico, ácido oxálico, ácido cítrico

co, hierro y otras sustancias indeseables formadas durante el cultivo. Los cationes reaccionan con los ácidos orgánicos y forman un precipitado gelatinoso que incluye hierro, manitol y sustancias cromogénicas. El precipitado se separa con filtración, decantación o centrifugación sin haber disminución apreciable de la potencia de la enzima. (63).

7. Adición de compuestos cuaternarios: Se basa en mezclar las aminas de la solución enzimática con un compuesto cuaternario para formar un precipitado entre las impurezas y los compuestos cuaternarios de amonio y en la separación del mismo de la solución de enzima. Los compuestos cuaternarios actúan también como preservativos para prevenir el crecimiento bacterial. (63).

8. Adición de lignina como precipitante de impurezas a pH alcalinos: En éste método se ajusta el pH a rangos alcalinos bajos para la absorción de impurezas y se adiciona lignina soluble en agua. Se remueven después la lignina con las impurezas absorbidas y se obtiene una solución con una enzima bastante purificada. La solución se trata entonces de tal manera que se obtenga un polvo seco de enzimas. (63).

9. Adición de ácido tánico y lignina a pH ácido como precipitante de impurezas: La enzima, por ejemplo: amiloglucosidasa, se trata con una solución de proteína precipitante seleccionada o coagulantes. Se filtra y centrifuga. La

porción líquida tiene la parte de amiloglucosidasas para purificar. Esta puede usarse como tal o concentrarse, evaporarse y secarse o deshidratarse con un líquido orgánico soluble en agua como acetona o etanol antes de usarse. La lignina y el ácido tánico son agentes para el tratamiento de preparaciones de amiloglucosidasa. La lignina es insoluble en agua, pero soluble en soluciones alcalinas de agua. El ácido tánico es soluble en agua. (63)

B. DESARROLLO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS.

1. Ajuste del pH. (91)

Reactivos:

- Solución de enzima (0.1 ml ó 1 mg/10 ml)
- Soluciones buffer a diferentes pH.
- Solución de sulfato de amonio saturada. (10%)

Técnica:

Ajustar el pH a varios valores para la solución de enzima. Si la enzima no se precipita, se añade suficiente cantidad de sulfato de amonio a cada alícuota y agitar para dar una saturación del 10% a 0°C. El precipitado formado debe centrifugarse y decantar el líquido sobrenadante.

Resultados:

Seleccionar el pH al que existió mayor precipitado.

2. Adición de disolventes orgánicos.^{*} (91).

Reactivos:

- acetona, etanol, metanol, propanol, isopropanol,
- Solución de enzima (0.1 ml. ó 1 mg/10 ml)

Técnica:

Los solventes orgánicos son enfriados a 0°C y la solución que contiene la enzima a 0°C. El disolvente es añadido lentamente con agitación continua. El precipitado puede ser separado de la solución después de su formación y disuelto en buffer o secado a baja temperatura para remover el disolvente. De otro modo la actividad enzimática puede ser afectada por la precipitación con disolventes.

Resultados:

Seleccionar el disolvente orgánico que provoque mayor cantidad de precipitado, como el adecuado para el efecto, y que no altere la actividad enzimática.

3. Adición de sales inorgánicas:(PROTEASA BACTERIANA)
(63).

Reactivos:

- Solución acuosa de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 10% (A)
- Solución de H_3PO_4 al 10% (B)
- Solución de Na_2SO_4 al 66% (C)

Técnica:

20 ml. de A se añaden a 200 ml. de solución de enzima, lentamente, con agitación. Mantener el pH a 8.5 por adición de solución de B hasta ajustar el pH. Después que se añadió todo A, la mezcla se ajusta a pH de 6.5 con la solución diluida de B. La mezcla se filtra en vacío. Se lava con

150 ml. de agua destilada. El agua del lavado se combina con el filtrado y se obtienen 350 ml. de una solución a la que se le agrega C (125g). Agitar la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente. El precipitado formado es filtrado y lavado con una solución de sulfato de sodio al 25% (100 ml). Al precipitado se le determina la actividad enzimática.

Resultados:

Reportar la cantidad de enzima obtenida en gramos y la actividad enzimática.

4. Adición de cationes (CARBOHIDRASA FUNGAL) (63)

Reactivos:

- Solución de CaCl_2 al 25%.
- Solución de NaOH.

Técnicas:

El pH de la solución de enzima se ajusta a 6 con una solución de NaOH y la muestra se divide en 5 alícuotas a cada una de las que se le adicionan diferentes cantidades de solución de CaCl_2 al 25%, hasta la completa precipitación de las impurezas. (ácido oxálico, glucónico o cítrico). Una vez libre de impurezas se procede a precipitar la enzima por cualesquiera de los métodos existentes para éste propósito.

CUESTIONARIO

1. ¿ En que se basa la precipitación de enzimas?.
Cuáles son los factores que la afectan?
2. ¿Qué importancia tiene la adición de sulfitos en la precipitación de enzimas?. Explique claramente.
3. ¿ La actividad de una enzima cruda y una enzima purificada es igual o distinta? ¿Qué tanto?
4. ¿Qué cuidados hay que tener en la extracción de una enzima intra y extracelular? ¿Por qué?
5. ¿Cuáles son las sustancias utilizadas comunmente para precipitar enzimas? ¿Cuáles son aceptadas para enzimas en la Industria Alimentaria?
6. ¿Qué pasos seguiría para precipitar y purificar una enzima que se emplee en alimentos?
7. Se sabe que el E.D.T.A. inactiva a algunas enzimas ¿Se podría emplear para precipitarlas?

OBSERVACIONES

1. En la extracción de enzimas vegetales, los buffers deben mantener un pH cercano a 7.5 y la fuerza iónica debe ser de 0.1 a 0.5.
2. En las plantas que contienen grandes cantidades de compuestos fenólicos se añade polietilenglicol o polivinilpirrolidona para proteger de la inactivación a la enzima.

3. El método sugerido para determinar la correcta solución de sales a emplear para precipitar, es tomar pequeñas cantidades de solución de enzima cruda en varios tubos, ajustar el pH previamente al valor de menor solubilidad (ésto es muy importante para una precipitación mas efectiva), mantener la temperatura a 0°C durante todo el experimento y añadir la sal con agitación continua hasta que se disuelva como solución saturada a 0°C.

La concentración de sales varía desde el 5 al 10% sobre el rango de no precipitación hasta el 80% de saturación.

Después de añadir y disolver la sal, los tubos se mantienen por 30,60, minutos y se centrifugan. El precipitado se redisuelve en un buffer de estabilidad de la enzima y se determina la actividad de las dos fracciones (liquide sobrenadante y precipitado). La actividad debe ser de 10% en la suma de las dos fracciones. En caso de ser mayor o mucho menor, se puede dializar la solución para eliminar el sulfato de amonio que interfiere en la actividad.

BIBLIOGRAFÍA

(2, 25, 43, 52, 56, 63, 76, 78, 85, 91)

PRACTICA No. 5: ESTABILIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS.

BASES TEÓRICAS

La integridad de la estructura tridimensional del sitio activo de una enzima es esencial para mantener su actividad.

En general, las enzimas son más estables a bajas temperaturas pero existen diferencias en su susceptibilidad al calor, las cuales están relacionadas con el tamaño y complejidad de la enzima.

Las enzimas son más estables en tejidos intactos o en homogenados que en la forma purificada y esto se debe a la diferencia de concentración de la proteína total presente en cada tipo de preparación, también las condiciones de máxima estabilidad presentan variaciones de una forma a otra.

La velocidad de desnaturalización de una enzima en ausencia de factores que la perturben como la proteólisis, es usualmente un proceso de primer orden, de ahí la importancia de conocer el tiempo necesario para destruir toda la actividad enzimática, ya que éste, o la constante de velocidad del proceso, serán los utilizados para determinarla.

La energía de activación para transformar reactantes en productos, en reacciones enzimáticas es del rango de 6,000

a 15,000 cal/ml., mientras la energía de desnaturalización de la enzima es del rango de 50,000 a 150,000 cal/ml. Así con una alta temperatura la desnaturalización es rápida debido al gran número de moléculas que tienen suficiente energía para pasar a un estado de desnaturalización.

Las enzimas tienen una desnaturalización irreversible en soluciones muy ácidas o muy alcalinas, el pH en el que esto ocurre varía con el tipo de enzima y éste es función de las condiciones de trabajo.

El pH de estabilidad de una enzima está usualmente influenciado por la presencia o ausencia de cofactores o de otras moléculas pequeñas y sufre modificaciones por otros factores como son: el tipo y concentración del buffer, la fuerza iónica, la constante dieléctrica del medio y la presencia o ausencia del sustrato.

Las diferencias de pH y temperatura de estabilidad pueden ser usadas para la purificación.

Existen métodos diferentes para la purificación de enzimas, los cuales están basados en: la diferencia de solubilidad de una proteína a otra, la cual se determina por la distribución de densidad de carga, grado de hidratación y la presencia de componentes no protéicos de la molécula como los fosfatos, carbohidratos o lípidos.

La interacción de la enzima con un grupo específico en la que se basa la metodología de cromatografía de afinidad, es un factor importante en el análisis.

La separación se basa en la diferencia entre las proteínas en materiales de intercambio iónico. El grado de separación de proteínas en base a sus propiedades de carga, deben ser realizados bajo condiciones donde las proteínas son más estables; la proteína puede ser removida del material insoluble de una manera selectiva, por variación de la concentración de sales o por medio de cambios en el pH.

En la separación basada en el tamaño, las proteínas difieren en sus pesos moleculares y por esto pueden ser separadas en función de sus diferentes sedimentaciones en el campo gravitacional. En ésta propiedad se basa el método de filtración en gel.

Existen otros métodos con los que se determina la pureza de una enzima como: la electroforésis, que depende de las diferencias en la carga, distribución de carga, tamaño, forma de las moléculas y la ultracentrifugación que se usa para determinar el PM y la homogeneidad de los preparados y que depende de la diferencia de densidad y tamaño de las moléculas. (13, 14, 18, 22, 25, 78, 91).

OBJETIVO

El alumno conocerá y aplicará algunos de los diferentes métodos de estabilización y purificación de enzimas, así como la importancia de los mismos en la industria Alimentaria.

FUNDAMENTO

La estabilidad de una enzima es función de la temperatura y del pH, fuerza iónica, naturaleza del buffer, presencia o ausencia del sustrato, concentración de la enzima, así como de otras proteínas en el sistema, tiempos de incubación y de la presencia o ausencia de activadores o inhibidores.

La afinidad enzimática es uno de los métodos de purificación basada en la unión de enzimas con un tipo de material adecuado.

PROCEDIMIENTO

1. Efecto de la temperatura. (91)

Incubar a varias temperaturas (15,25,35,45,55 °C) soluciones de enzima problema, en ausencia de sustrato, permaneciendo las otras condiciones (pH, concentración de activadores u otros iones, etc), constantes. Tomar alícuotas de la mezcla de incubación a intervalos de tiempo de 15 a 30 min.

Colocar las alícuotas en un baño de hielo o directamente en la mezcla de reacción que contiene el sustrato a pH y temperatura óptimas para la enzima. Determinar la actividad presente en cada alícuota mediante pruebas cualitativas o cuantitativas.

Los datos experimentales que se obtengan de la temperatura de estabilidad mas adecuada, serán diferentes para cada tipo de enzima y dependerán del tipo de enzima y origen de la misma, así como la forma en que se encuentre ya sea purificada o en concentrado crudo.

2. Determinación del pH de estabilidad. (91)

Añadir a diferentes tubos de ensayo una cantidad fija y medida cuantitativamente de buffers de diferentes valores de pH (3,5,7,8,10), de manera que se trabaje en zona ácida, neutra y básica. Equilibrar la temperatura en un baño de agua por 10 minutos. Añadir una alícuota constante de enzima en cada tubo a intervalos de tiempo de 15 a 30 minutos. Sacar una alícuota y añadir a una solución de sustrato a una temperatura óptima de actividad y pH fijo, con suficiente concentración de manera que el pH final de todas las alícuotas sea el mismo durante el ensayo de actividad.

Aún cuando el pH al que se efectúa el ensayo de actividad no sea el óptimo, puede estar en la región que la enzima sea estable durante el análisis.

3. Afinidad enzimática. (20, 52, 63,91)

Llevar la enzima a una solución que esté en las condiciones de pH y temperatura de estabilidad.

Preparar la columna de afinidad siguiendo el método adecuado al tipo de enzima del que se trate.

Eluir la solución de enzima en la columna para que se fije a la misma.

Extraer la enzima de la columna por medio de soluciones buffer seleccionadas previamente, de manera que, bajando con cambios de pH, se eliminen las impurezas y se obtenga la enzima con algún grado de purificación.

Una vez realizado lo anterior, se procederá a utilizar la enzima ya sea precipitándola o manteniéndola en solución a condiciones estables.

La preparación de la columna será efectuada por el profesor de prácticas por ser un proceso que requiere mucho tiempo.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

A. DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS

1. ESTABILIZACIÓN

Para evitar la desnaturalización cuando se trabaja con una enzima precipitada, se debe agregar al extracto proteínicas como gelatina, albúmina de suero de bovino, o albúmina de huevo ya que la concentración de proteína total presente es un factor que influye también en la estabilidad de las enzimas.

Los agentes empleados para la estabilización de enzimas líquidas incluyen compuestos orgánicos e inorgánicos como benzoato de sodio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, gliceról, propilenglicol, sorbitol y cloruro de sodio. Los productos sólidos son ajustados a potencias estándares por adición de diluentes como almidón, lactosa, dextrosa, sacarosa, harinas, sales, gelatinas y caseína.

En casos en que la filtración del producto alimenticio sea practicada después del tratamiento con enzima, el diluyente puede tener tierra de diatomeas. Los buffers y otras sales como citratos o fosfatos, son también usados en la formación de productos enzimáticos líquidos o sólidos para mantener la enzima en condiciones favorables. (91).

2. PURIFICACIÓN DE ENZIMAS POR ADSORCIÓN EN COLUMNA.

Existen varios métodos para adsorber una enzima a una columna. Estos se basan en las diferentes propiedades que presentan las proteínas. Entre ellos se tienen:

- Cromatografía por afinidad: una solución de enzimas se hace pasar a través de una columna preparada con un material insoluble (SOPORTE), el cual interacciona con un grupo de la enzima que es específico. La enzima se retardará debido a ésta unión con el grupo que actuará como sustrato mientras las otras proteínas y sustancias pasan directamente a través de la columna; la enzima deseada puede ser eluída de la columna por medio de: cambios en la fuerza iónica, el pH, o la constante dieléctrica del eluyente. Este método se utiliza en la purificación de enzimas porque se pueden obtener puras con pocos pasos de purificación. (91).

- Cromatografía de intercambio iónico: en la práctica se emplea un material insoluble, con algunas propiedades hidrofílicas, que contenga grupos ionizables de carga opuesta a la carga neta de la proteína. En adición, la proteína puede ser rápidamente removida del material insoluble con un eluyente que actúe de una manera selectiva, lo cual puede ser realizado por variación de la concentración de sales de la solución, o por medio de cambios en el pH, (20, 91)

La elección de los materiales para usarse en la cromatografía de intercambio iónico dependerán de la naturaleza de la carga en la proteína. En la práctica actual, otros factores como la unión con hidrógeno, distribución de carga y tamaño de la molécula proteica pueden ser una regla en el comportamiento de las proteínas en las columnas de intercambio iónico. El pH adecuado, es dictado, entre otras cosas, por el rango de pH en el cuál la proteína es estable.

Un gran número de materiales de intercambio iónico son usados para la cromatografía de proteínas, entre los que se encuentran:

- Amberlita IRC-50: La resina es una matriz insoluble con uniones cruzadas por divinilbenceno conteniendo grupos carboxílicos libres, los cuales dan la capacidad de intercambio catiónico. Contiene alrededor de 10 miliequivalentes de grupos carboxílicos por grano. El pH de 6 a 6.5 es efectivo para moléculas de bajo P.M. como proteínas básicas (cromocromo, lisozima, ribonucleasa, quimotripsina y bromelina. La desventaja es que son completamente inertes al ataque enzimático y deben usarse soluciones con alta fuerza iónica. Estas pueden ser necesarias para mantener la proteína en solución y prevenir la interacción con componentes no proteicos. (91).

• Derivados de la celulosa: Son preparados por modificaciones químicas de la celulosa. Son inocuos a las proteínas y pueden ser usados sobre y bajo las condiciones de subsecuentes regeneraciones. Tienen alta capacidad para las proteínas. Bajo condiciones ideales, 1 g de celulosa de intercambio iónico en peso seco es capaz de unir aproximadamente 1 g. de proteína. De 100 a 150 g. de proteína pueden ser usados en una columna de 2 cm. de diámetro. Los materiales usados frecuentemente son carboximetilcelulosa (CMC) y dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa). (91).

Sephadex: Compuesto por polímeros de dextranas, tienen la ventaja sobre los derivados de celulosa de que pequeñas enzimas pueden degradar el material de soporte. Las partículas son más uniformes en tamaño y su capacidad para las proteínas es mayor. Tienen la desventaja de que se hinchan o encogen marcadamente dependiendo de la fuerza iónica de la solución. (91).

B. DESARROLLO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS.

1. Cromatografía de intercambio iónico. (91).

Reactivos:

- Solución de enzima (0.1ml ó 1 mg/10 ml).
- Solución buffer pH: 3,5,7,9. (0.005-0.01M)
- Material de intercambio iónico.

Técnica:a) Determinación de las condiciones de adsorción y elución de enzima.

Estas, se establecen por un experimento preliminar que define las mejores condiciones de adsorción y elución de las proteínas:

Añadir a tubos de prueba, pesos constantes de pequeñas cantidades de material de intercambio iónico que se encuentren equilibradas con buffers a diferentes pH (3,5,7,9).y que tengan una o dos diferentes concentraciones de buffer (usualmente: 0,005 - 0,01M). Posteriormente se agregan pequeñas alícuotas de solución de enzima cruda. Mezclar con agitación la solución de enzima y el material de intercambio iónico y mantenerlos durante 15 minutos a 0°C. Al término del tiempo, centrifugar y analizar en el líquido sobrenadante la actividad y concentración de proteína (cualitativa o cuantitativamente). Los resultados indicarán bajo qué condiciones se adsorbe preferentemente la enzima. El tubo que dé los mejores resultados se suspende en un buffer que contenga una baja concentración de NaCl (0,005-0,05M). Después de 5 a 15 min. centrifugar el tubo y analizar en el líquido sobrenadante la actividad enzimática y la concentración de proteínas. La concentración de cloruro de sodio es incrementada en sucesivos lavados hasta que toda la actividad de la enzima sea removida del material de intercambio.

b) Preparación de la columna.

El material es suspendido en un gran volumen de agua, en un cilindro graduado (aproximadamente 40g. de material en 2 litros de agua), y se deja hasta que se logre fijar del 79 al 90% del mismo. El líquido sobrenadante es extraído para remover las partículas finas. Este proceso de lavado se continúa hasta que el material se fije uniformemente y el líquido sobrenadante sea claro. El tamaño se forma mejor con DEAE-celulosa, usando una suspensión inicial en ácido clorhídrico 0.25M. Cuando mucho, durante esta operación se puede remover del 25 al 50% del material.

Resultados:

Seleccionar el material y las condiciones adecuadas y preparar la columna de cromatografía de intercambio iónico.

- Cromatografía de intercambio aniónico débilmente básico (ALFA AMILASA). (63).

Reactivos:

- Solución de acetato de sodio pH 6.5 - 7.0
- Solución de NaOH 0.5N
- Solución de enzima (0.1ml o 1 mg/10ml)
- Duolita A-2
- Columna de vidrio: 1 x 6 in.

Técnica:

Una columna de intercambio iónico de Duolita A-2 débilmente básica se ajusta a pH de 7 pasando una solución de acetato de sodio pH 6.5 a través de la misma. Adicionar una determinada cantidad de solución de alfa amilasa fungal previamente ajustada a pH 6.5 con NaOH 0.5N. (la cantidad adicionada está en una relación de 2 volúmenes de enzima por cada volumen de material de intercambio).

Pasar 0.2 volúmenes de agua por cada volumen de solución de enzima para asegurar la extracción de la amilasa de la columna.

Resultados:

Determinar la cantidad de actividad y proteína presente en la solución de enzima antes y después de pasar por la columna. Interpretar los resultados.

- Cromatografía de intercambio catiónico. (PROTEASA FUNGAL). (63).

Reactivos:

- Solución de ácido acético
- Solución de acetato de amonio diluido M/50 pH 4.5-4.7
- Solución de acetato de sodio 1N pH 5.5
- Solución de NH_4OH 1-2N
- Acetona
- Resina de amberlita IRC-50
- Solución de enzima (0.1ml ó 1 mg/10 ml).

Técnica:

Filtrar y acidificar con ácido acético el cultivo. Llevar el pH a menos de 5. En éste pH, las proteasas son estables cuando se diluyen o están en presencia de los otros constituyentes del cultivo. Pasar el cultivo acidificado através de una columna de intercambio catiónico (Amberlita 1-RC 50 débilmente ácida). Antes de la adsorción, lavar la resina en la columna haciendo pasar a través de ella un buffer de acetato de amonio diluido M/50 a pH 4.5 -4.7. La adsorción es corrida en rango de flujo de 2 a 4 ml/min cm² de sección transversal de la columna. Lavar con un volúmen de agua equivalente a la mitad del volúmen del cultivo. El rango de fluidéz puede ser mayor que el usado para la adsorción. El agente eluyente usado puede ser el mismo que el empleado antes de la adsorción ó acetato ó citrato de sodio al mismo pH y concentración. La elución es entonces corrida pasando una solución de acetato de sodio 1N a pH 5.5. La velocidad de flujo empleada es de 0.5 a 1 ml/ min cm².

Los eluyentes que salen deben ser neutralizados (ya que son susceptibles de disminuir rápidamente su actividad), con una solución de hidróxido de amonio diluido 1 o 2 N. Después de ésto, la enzima se precipita con acetona y se redisuelve en un buffer a pH menor de 5. para otra fijación en una columna de Amberlita IRC-50 fina. Después de fijada la enzima, se lava la columna como en la primera adsorción con un buffer de pH 5M/50 usando un volúmen aproximadamente igual o equiva

lente al líquido adsorbido, eluyéndose después con una solución de acetato de amonio 0.5M a pH 5.5. El rango de flujo es de 0.5ml/min cm². La solución eluida deberá ser neutralizada como en la primera adsorción. La enzima puede ser precipitada con acetona o dejada en solución manteniéndola en refrigeración sin que se deteriore.

- Filtración en gel (GLUCOAMILASA), (63).

Reactivos:

- Gel de Sephadex G-100
- Columna de vidrio: 1 x 6 in.
- Solución de ácido sulfúrico pH 4
- Solución de enzima (0.1ml o 1mg/10 ml).

Técnica:

Aproximadamente 75 ml. de Gel de Sephadex G-100 se colocan en una columna de filtración de 1 x 6 pulgadas. El pH del gel se ajusta haciendo pasar varias veces agua con ácido sulfúrico a través de la columna hasta que el efluente posea el mismo pH que el influente. Ajustar 20 ml. de una preparación de enzima al mismo pH de la columna y adicionarlos a ella. Eluir las muestras con agua destilada y ajustarlas al mismo pH de la columna.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son los factores que intervienen en la temperatura y pH de estabilización de las enzimas?
2. ¿A qué se debe la diferente estabilidad de las enzimas en tejidos intactos y enzimas purificadas?
3. En la industria ¿Cuáles son las sustancias que se emplean para estabilizar enzimas en solución?
4. ¿Cuáles enzimas son usadas en la industria láctea para medir la adecuada pasteurización?
5. ¿Cuales son las ventajas y desventajas que se encuentran al purificar enzimas?
6. ¿En qué bases debe fundamentarse la cromatografía de intercambio iónico para la purificación de enzimas?
7. ¿Cuáles son las ventajas que se obtienen al inmovilizar una enzima en una columna?

OBSERVACIONES

Las pruebas de actividad enzimática que se realicen en las determinaciones de pH y temperatura de estabilización, podrán ser cualitativas o cuantitativas utilizando los métodos conocidos y la veracidad de los datos obtenidos estará relacionada con la forma en que se efectúen, el tiempo disponible para su realización y todos los factores que influyan en la misma.

Para efectuar ésta práctica se requieren al menos dos baños de temperatura constante y buffers a diferentes - pH.

Las pruebas se llevarán a cabo con soluciones de enzima del medio de cultivo inducido, para que con los datos obtenidos se pueda trabajar en la purificación.

La purificación de enzimas por los métodos de fijación en columna requiere de un especial cuidado porque se tiene que tomar en cuenta cuales son los materiales que se van a emplear en las diferentes enzimas.

En el caso de que la fijación de enzimas no se pueda realizar, se sugiere realizar una prueba al menos para todo el grupo.

BIBLIOGRAFÍA

(18,22,25,33,47,50,52,53,63,78,91,85)

PRÁCTICA No. 6: OBTENCIÓN DE ENZIMAS POR INDUCCIÓN MICRO-
BIANA.

BASES TEÓRICAS:

Las enzimas comerciales usadas en la industria de alimentos son producidas por cada una de las clases de microorganismos: HONGOS, (amilasa, proteasa, glucoamilasa, celulasa, pectinasa, catalasa, etc), BACTERIAS (amilasa, proteasa, catalasa, lipasa, etc) y LEVADURAS (invertasa, lactasa, etc).

Los cultivos de *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. niger*, *B. subtilis*, *S. cereviceae*, son de particular importancia.

Cada cultivo de microorganismos produce una gran cantidad de enzimas cuya función es hidrolizar materiales nutritivos y reacciones metabólicas. La cantidad absoluta y relativa varía en cada especie y aún en cultivos de la misma especie.

Los procesos de inducción están involucrados en la selección del cultivo original para la producción de enzimas y en el descubrimiento de nuevos cultivos de mejor potencial.

El crecimiento inicial es realizado sembrando los cultivos en un medio de agar conteniendo el sustrato potencial, las colonias son seleccionadas por estudios que mues -

tran la gran zona de acción en el sustrato y se hacen crecer como un cultivo puro en el laboratorio. Las variaciones pueden ser hechas en los constituyentes del medio y en las condiciones de crecimiento hasta llegar a tener el máximo potencial de producción de enzima.

Cuando se desea tener una enzima que produzca una reacción determinada, la fuente debe ser buscada en microorganismos, métodos de inducción y procedimientos de separación adecuados.

Se ha encontrado que los cultivos mutantes tienen gran importancia en la producción de enzimas comerciales. Algunas veces los mutantes multiplican la producción de enzima obtenida de los cultivos originales. Por otra parte, pueden producir poca cantidad de contaminantes de enzima o productos de metabolismo indeseables; ésto, facilita la separación de las enzimas y su purificación. Los mutantes son obtenidos al someter a los cultivos a agentes mutagénicos tales como Luz Ultravioleta, Rayos X o agentes químicos, a tal grado que muchas de las células mueran. Los cultivos, son entonces colocados en un medio de separación conteniendo los sustratos apropiados. Las colonias son escogidas para nuevos aislamientos por sus características superiores comparándolas con los cultivos originales por los procedimientos comunes de selección.

Las fermentaciones convencionales emplean cultivos

vivos, los cuales crecen produciendo un sistema enzimático y simultáneamente efectúan la conversión de sustratos a productos finales. En éstas fermentaciones es siempre necesario la suplementación de material nutritivo y el sustrato es usado para la producción de material celular y en una de las reacciones que efectúan algunas enzimas presentes en las células. Algunas veces estos decrementos pueden ser minimizados por el empleo de células como fuentes de los sistemas enzimáticos.

Cuando una enzima o sistema enzimático de dos o tres enzimas están involucradas en una reacción deseada, es preferible la separación de cada enzima ya que se disminuyen las reacciones indeseables y por que aumenta la concentración de las enzimas, necesitandose pequeñas cantidades de enzima lo que evita cambios indeseables en el sabor y composición de productos alimenticios.

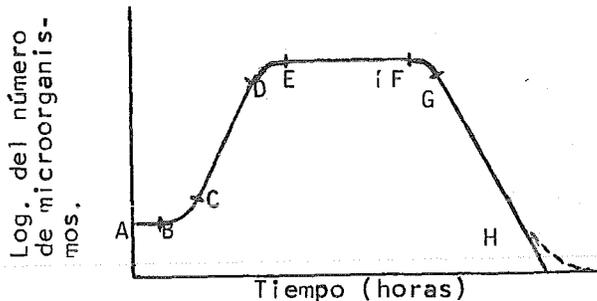
Los cultivos se desarrollan por inoculación de cultivos puros en medios estériles con nutrientes en una composición adecuada, pH, temperatura óptima bajo la presencia o ausencia de oxígeno. Las enzimas comerciales son usualmente derivadas de microorganismos aerobios.

Los métodos de cultivos sumergidos para hongos y bacterias en el laboratorio, se hacen crecer en matraces en aereación o en pequeños recipientes con agitación y aereación (Fermentadores).

Comercialmente son empleados tanques hondos, los cuales son equipados para introducir aire estéril y tener una agitación vigorosa. La cantidad de aire, el grado de dispersión y la cantidad de agitación son variables interdependientes. Las condiciones apropiadas para una máxima producción de enzima deben ser determinadas para cada proceso individual. Se emplean controles estrictos para obtener producciones consistentes de enzimas.

Los principales fundamentos para la producción de enzimas microbianas en el laboratorio y a gran escala en una planta son los mismos, sin embargo el tipo de equipo y la cantidad de material que se necesitan son muy diferentes.

Los microorganismos se multiplican por división celular, usualmente las curvas de población de los microorganismos inoculados en un medio de crecimiento favorable pueden ser divididas en varias fases:



A-B FASE LAG; B-C FASE DE ACELERACIÓN POSITIVA; C-D FASE LOGARÍTMICA O DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL; D-E FASE DE ACELERACIÓN NEGATIVA; E-F FASE MÁXIMA ESTACIONARIA; F-G FASE DE MUERTE ACELERADA; G-H FASE DE MUERTE.

En la fase inicial, el cultivo se establece y multiplica, esta FASE LENTA, puede ser corta o larga dependiendo del microorganismo, del medio y de las condiciones empleadas.

En el laboratorio, esta fase es de poca importancia por lo general ya que el mantenerla estéril no presenta problemas, sin embargo en la planta industrial, es deseable disminuir la fase lenta o eliminarla puesto que la prevención de la contaminación en el cultivo es un problema constante. Es usual, por lo tanto, usar la misma composición de siembra en la fermentación de producción y el emplear una gran cantidad de inóculo para la activación del crecimiento en el cultivo. Estos procedimientos pueden eliminar completamente la fase lenta en una planta.

La segunda fase es la de MULTIPLICACIÓN ACELERADA, usualmente designada como la FASE DE CRECIMIENTO LOGARÍTMICO O EXPONENCIAL. Puede asumirse que durante esta fase los microorganismos son completamente viables y de igual vigor; sin embargo, antes de que la máxima densidad de población sea alcanzada, los mecanismos de restricción pueden entrar en juego tales como el consumo de nutrientes esenciales o la presencia de productos de inhibición/ El límite de crecimiento es determinado por el volumen y composición del medio, pero si un medio de cultivo fresco es continuamente adicionado, es posible prolongar el crecimiento casi indefinidamente en la fase de crecimiento logarítmico. Esta es la base de los pro-

cesos de fermentación continuos.

Ordinariamente en los cultivos la fase logarítmica es seguida por una FASE ESTACIONARIA durante la cual la población celular permanece casi constante, algunas células continúan reproduciéndose, otras permanecen estáticas aunque viables y algunas pueden morir. Hay que considerar la variación del vigor de cada célula y probablemente el tipo y grado de su metabolismo.

El estado final es la declinación poblacional con la muerte de muchas células y lisis usual.

Los factores de crecimiento microbiano y de producción y estabilidad de enzimas, plantean problemas de optimizar el tiempo de recolección en el laboratorio y en la planta.

Dependiendo del microorganismo y de la enzima deseada, en las fermentaciones en el laboratorio son comunes de 2 a 5 días, mientras que fermentaciones en plantas pueden requerir solamente de 12 horas a 6 días. En el laboratorio debido a los pequeños volúmenes que se usan cuando la máxima producción es alcanzada, los cultivos pueden ser rápidamente recolectados por métodos simples que involucran pocas horas. En la planta, algunas horas pueden ser involucradas para las operaciones análogas de filtración, concentración, precipi-

tación, recolección y secado de las enzimas. (21, 29, 41, - 43, 75, 78, 81).

OBJETIVO

El alumno obtendrá una enzima microbiana aplicable a la Industria Alimentaria, por medio de la inducción de un microorganismo seleccionado.

FUNDAMENTO

La producción de enzimas para empleo industrial y como alimento, se ha desarrollado en forma independiente en diversas industrias. Las enzimas de fuentes microbianas como bacterias, hongos y levaduras, se producen en las industrias de fermentación.

En todas las fermentaciones, las enzimas son los catalizadores activos que dirigen la cadena de reacción química compleja. Las fermentaciones se controlan escogiendo los microorganismos y el medio adecuado, de manera que se produzca en abundancia una enzima o un grupo de ellas.

PROCEDIMIENTO

1. Selección del microorganismo adecuado: Los microorganismos empleados son: hongos del género *A. niger*; bacterias como *B. subtilis* y levaduras del género *S. cereviceae*.

2. Medio de conservación: es un medio nutritivo general para la conservación de cepas de las tres especies - de microorganismos a inducir. Se deberán sembrar al menos 3 tubos con medio sólido y se sellarán dos de ellos una vez que se desarrollen los microorganismos CEPA. El sello podrá ser de parafina ó de algún otro material ó método conocido .

A continuación se mencionan tres medios generales:

- MEDIO SABOURAD. (71)

peptona de carne	1.0%
glucosa	5.0%
Agar simple	1.5%
Agua	92.5%

- MEDIO GELOSA NUTRITIVA (71)

Extracto de carne	0.3g
Peptona	0.5g
Agar	1.5 - 1.8g
Agua	100.0 ml.

- MEDIO DE GELATINA NUTRITIVA (71)

Está constituido por las mismas substancias que el medio de gelosa nutritiva, variando el agar por 15 g. de gelatina.

Los tubos que contengan el medio se ponen a esterilizar y se siembran posteriormente.

3. Medio de crecimiento general: (PIE DE CUBA)(71)

Este medio debe tener nutrientes esenciales para el crecimiento del microorganismo como son: agua, fuentes de carbono y energía, fuentes de nitrógeno y minerales, así como oxígeno e hidrógeno. Los organismos heterótrofos toman sus nutrientes de la siguiente forma:

- FUENTE DE CARBONO: carbohidratos como glucosa y sacarosa. Estos le proporcionan energía necesaria para sus funciones metabólicas.

- FUENTE DE NITRÓGENO: proteínas, aminoácidos, peptonas, urea o sales inorgánicas como las sales de amonio.

- FUENTE DE MINERALES: el requerimiento varía con el tipo de microorganismo. Algunas sales son importantes ya que intervienen en la formación de coenzimas, enzimas y en las reacciones metabólicas.

- FUENTE DE OXÍGENO: la introducción de oxígeno al medio por aereación es importante para el crecimiento microbiano.

Para la fase de crecimiento general se emplea aprox

madamente una semana, después de la que se pasará al medio de inducción.

4. Fase de inducción: En ésta fase, el microorganismo se hará crecer en un medio adecuado para la producción de la enzima deseada (la cual se seleccionó previamente en el PIE DE CUBA). Existen medios para producción de enzimas con microorganismos, que han sido probados industrialmente (63). La cantidad de sustrato adecuado para la producción de la enzima escogida, se irá aumentando paulatinamente, de manera que se induzca al microorganismo a su elaboración. Se pueden realizar varias inducciones, sugiriéndose para cada una de ellas pruebas de actividad enzimática.

Una vez que el microorganismo ha producido la enzima con la actividad enzimática deseada, se dá por terminada la fase de inducción y se procederá a la extracción del medio que contiene la enzima exento del microorganismo por los métodos adecuados. Se procederá a separar la enzima y mantenerla en condiciones de estabilidad para su futura aplicación a la producción de alimentos.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

A. DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS

Los microorganismos necesitan de la presencia de nutrientes adecuados para su crecimiento, desarrollo y síntesis de factores esenciales para su actividad vital. Por tal motivo, se requiere de un medio básico formado por materias como agua, fuentes de carbono y energía, nitrógeno, elementos minerales, así como de los medios para proveer hidrógeno y oxígeno.

Como fuente de energía se consideran sustratos orgánicos (AZÚCARES) ya que al romperse los carbohidratos a CO_2 y H_2O , se libera una cantidad relativamente alta de energía.

Los microorganismos sintetizan su material celular a partir de la presencia de carbono que se produce en la degradación de las sustancias que proporcionan energía.

Como fuentes de nitrógeno se pueden emplear: proteínas, aminoácidos, peptonas, urea o sales inorgánicas de amoníaco.

Por su parte, el agua sirve a la célula para distribuir los materiales en la misma.

Para llevar a cabo las funciones estructurales y fisiológicas, el microorganismo requiere en menor cantidad, la presencia de sustancias como fósforo, azúfre, potasio, calcio magnesio, sodio, cloro, además de elementos importantes para el metabolismo ya que son constituyentes de enzimas o coenzimas, Entre éstos se tienen sustancias como manganeso, cobre, zinc, molibdeno, cobalto y boro.

B. DESARROLLO DE LOS MÉTODOS

DISEÑO DE MEDIO (71).

A. Fuente de energía:

Durante la oxidación de carbohidratos a CO_2 en la glicólisis y el ciclo de Krebs, se producen ADP y ATP. De esta manera, los azúcares fermentables: glucosa y fructosa producen 38 ATP por mol de azúcar (180g). Por otra parte se sabe que cada ATP producido proporciona la energía suficiente para producir 6 g. de células:



1 ATP ----- 6 g. de células

X ATP ----- 1 g. de células

$$\boxed{X = 0.166 \text{ ATP/g de células}}$$

180 g hexosa ----- 38 ATP

X g hexosa ----- 0.166 ATP

$$\boxed{X = 0.786 \text{ g hexosa/g. de células}}$$

B. Fuente de Carbono.

El 50% de los requerimientos del microorganismo es tan representados por la fuente de carbono.

1 g. de células	-----	0.5 g. de carbono
180 g. de hexosa	-----	72.0 g. de carbono
X g. de hexosa	-----	0.5 g. de carbono

$$X = 1.25 \text{ g. de hexosa/g. de células}$$

Para producir 1.0 g. de células se necesitan:

FUENTE DE ENERGÍA: 0.786 g. de hexosa

FUENTE DE CARBONO: 1.250 g. de hexosa

FUENTE TOTAL : 2.036 g. de hexosa

C. Fuente de Nitrógeno.

El nitrógeno se adicionará como fosfato de amonio - dibásico:

1 g. de células	-----	0.1 g. de Nitrógeno
132.15 g (NH ₄) ₂ HPO ₄	-----	28.0 g. de nitrógeno
X g	-----	0.1 g de "

$$X = 0.472 \text{ g. (NH}_4\text{)}_2\text{HPO}_4\text{/g. de células}$$

D. Fuente de Fósforo.

El fósforo no es necesario agregarlo ya que va incluido en otras fuentes en forma de ión fosfato y excede al 2% del fósforo requerido.

E. Fuente de Calcio.

El Calcio se añadirá como cloruro de calcio.

1.0 g de células	-----	0.009 g de calcio
110.9 g. de CaCl_2	-----	40.0 g de calcio
X g. de "	-----	0.009 "

$$X = 0.0249 \text{ g Ca Cl}_2/\text{g de células.}$$

F. Fuente de Potasio.

La fuente de potasio representa el 0.5% de los requerimientos de la cepa y se adiciona en forma de sulfato de potasio.

174.27 g. de K_2SO_4	-----	78.0 g. de potasio
X g. de "	-----	0.005 g "

$$X = 0.011 \text{ g de K}_2\text{SO}_4/\text{g. de células.}$$

G. Fuente de Azúfre.

El porcentaje de azúfre es superado mediante la adición de las fuentes de potasio, magnesio, manganeso, zinc, sodio, hierro y cobre.

H. Fuente de Magnesio.

Se requiere un 0.17% de magnesio y se agrega en forma de sulfato de magnesio heptahidratado.

246.3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-----	24.3 g. de magnesio
X g "	-----	0.0017 g. "

$$X = 0.017 \text{ g MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{g. de células.}$$

I. Fuente de Manganeso.

Se requieren 0.003% y se añaden como sulfato de manganeso hidratado.

$$\begin{array}{rcl} 168.94 \text{ g. MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} & \text{-----} & 54.94 \text{ g. de Mn.} \\ X \text{ g} & \text{''} & 0.00003 \text{ g. de Mn.} \end{array}$$

$$X = 0.0000922 \text{ g MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O/g. células}$$

J. Fuente de Zinc.

Se requieren 0.017% y se agrega como sulfato de Zinc heptahidratado.

$$\begin{array}{rcl} 287.54 \text{ g ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} & \text{-----} & 65.37 \text{ g Zn} \\ X & \text{''} & 0.00017 \text{ g Z.} \end{array}$$

$$X = 0.000747 \text{ g Zn SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O/g. de células}$$

K. Fuente de Cobre.

Se requieren 0.002% y se añaden como sulfato de cobre pentahidratado.

$$\begin{array}{rcl} 249.68 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} & \text{-----} & 63.54 \text{ g de Cu} \\ X & \text{''} & 0.00002 \text{ g de Cu} \end{array}$$

$$X = 0.0000785 \text{ g de CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O/ g de células}$$

L. Fuente de sodio.

Se requiere 0.15% . Se adiciona como cloruro de sodio

$$\begin{array}{rcl} 58.44 \text{ g NaCl} & \text{-----} & 22.99 \text{ g de sodio} \\ X & \text{''} & 0.0015 \text{ g de sodio} \end{array}$$

$$X = 0.00381 \text{ g NaCl/g de células.}$$

M. Fuente de Hierro.

La fuente de hierro representa el 0.017% de los requerimientos y se añade como sulfato ferroso,

$$\begin{array}{rcl} 278.03 \text{ g de } \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} & \text{-----} & 55.84 \text{ g Fe.} \\ X & & \text{-----} \quad 0.00017 \text{ g Fe.} \end{array}$$

$X = 0.000846 \text{ g FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g de célula}$

PREPARACIÓN DEL MEDIO

Se pesan cuidadosamente todas y cada una de las sustancias en una balanza analítica. Se disuelven las sales en las dos terceras partes del volumen total de agua y los carbohidratos en el volumen restante.

ESTERILIZACIÓN

El medio se esteriliza a 121°C y 1.4 kg/cm² durante 10 minutos. Después se enfría a chorro de agua. Una vez frías las soluciones se mezclan en una zona estéril, se mide y ajusta el pH al adecuado al microorganismo.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son las sustancias esenciales para el crecimiento microbiano?
2. ¿Cuáles son los factores que determinan la producción de una enzima microbiana?
3. Explique claramente la función del medio general de crecimiento.
4. Indique cuáles de las enzimas utilizadas en la Industria Alimentaria se pueden obtener por vía microbiana.
5. Mencione al menos 3 ejemplos de enzimas microbianas obtenidas actualmente a nivel industrial.

OBSERVACIONES

1. Una vez que el microorganismo crezca en el medio general, se sugiere realizar pruebas cualitativas de identificación de las enzimas producidas para seleccionar aquella que se quiera obtener.
2. Cuando se esté desarrollando la fase de inducción se efectuarán pruebas de activadores e inhibidores, actividad enzimática y pruebas de precipitación.

BIBLIOGRAFIA.

15, 21, 23, 27, 32, 34, 35, 36, 39, 41, 44, 55, 63, 71, 75, 78, 81, 82, 84, 85.

PRÁCTICA No. 7. APLICACIÓN DE ENZIMAS A LOS ALIMENTOS.

BASES TEÓRICAS.

La aplicación de enzimas a los alimentos abarca tanto a las enzimas presentes de manera natural, como a aquellas que se añaden con propósitos específicos.

Las fuentes de obtención de enzimas pueden ser: animal (renina, pepsina), vegetal (papaina, bromelina) o microbiana (amilasa bacteriana, proteasa fúngal) y pueden ser utilizadas bajo varios aspectos como son:

1. Enzimas en el almacenamiento y procesamiento de los alimentos.

La cantidad y clase de enzimas cambia continuamente durante el desarrollo y maduración. Ellas, son benéficas durante el desarrollo y crecimiento, aunque un imbalance en sus actividades puede guiar a un estado indeseable de los alimentos. Aún cuando un animal muere, el sistema enzimático continúa funcionando hasta que se termina el sustrato o el pH cambia a otro desfavorable para la acción de las enzimas.

Durante la maduración de frutas y vegetales, la actividad enzimática aumenta: la velocidad de respiración se incrementa, hay conversión de almidones a azúcares, se degrada la clorofila y se incrementa el tamaño de las células. To

das éstas actividades se consideran benéficas en las frutas mientras que la degradación de la clorofila puede considerarse como indeseable en algunos vegetales verdes.

Después del proceso de maduración, continúa la actividad de las enzimas hidrolíticas de manera que sin condiciones de atmósfera controlada, las frutas se sobremaduran y se pudren, deteriorándose los tejidos en los vegetales. Los factores que afectan la actividad enzimática son de gran utilidad en la manipulación y control de las enzimas después de la cosecha. El almacenamiento a bajas temperaturas disminuye la actividad enzimática y el tiempo en que el producto se convierte en inaceptable aumenta. El almacenamiento a 0°C es inconveniente debido a que aumenta la actividad enzimática porque el substrato está en mayor contacto con la enzima. (91).

En las frutas, el incremento de la respiración se debe a la acción de oxidorreductasas. Esto se evita disminuyendo la temperatura y cambiando la atmósfera a otra con menor cantidad de oxígeno por medio de N₂ y CO₂.

La completa exclusión del oxígeno es indeseable ya que requieren ciertos procesos oxidativos para mantener la integridad de las células. El almacenamiento a bajas concentraciones de oxígeno puede provocar en papas y algunas frutas, el obscurecimiento y en vegetales y frutas la pérdida de sabor.

Los dos mejores métodos de control de actividad enzimática en alimentos son el tratamiento por calor y la congelación. El primero destruye la actividad enzimática; un tratamiento adecuado del calor en frutas y vegetales es determinado por medio del índice de actividad de peroxidasa, el cual indica que se han destruido todas las demás enzimas. La congelación, no destruye la actividad enzimática, sólo la disminuye, mientras está el alimento en el almacén. Cuando los alimentos no reciben un proceso de escaldado antes de la congelación, hay una marcada aceleración de la actividad enzimática inmediatamente después del descongelamiento.

La actividad enzimática indeseable para un alimento puede ser deseable para otro. Por ejemplo, la polifenoloxidasas en plátanos provoca un oscurecimiento indeseable, mientras que en el café, té y pasas, se necesita para obtener su color característico. (91).

2. Enzimas en la digestión y asimilación de alimentos.

El proceso de digestión y asimilación de alimentos está controlado por hormonas que ejecutan su acción por medio de enzimas involucradas en éstos procesos. Algunas son: las amilasas, proteasas y glucosidasas de la boca; las esterasas lipasas, fosfatasas, nucleasas y enzimas del transporte activo de aminoácidos, ácidos grasos, glicerol, purinas, etc. pre

presentes en el tracto gastrointestinal y en su mucosa. Las enzimas de la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos, etc. presentes en el hígado y otras.

3. Enzimas en la salud y enfermedades.

Algunas enfermedades se han asociado a la ausencia o anomalía de enzimas específicas del metabolismo. Estas enfermedades son debidas a defectos genéticos y sólo se previenen por reconocimiento médico y control por medio de dietas adecuadas. Un ejemplo es la ausencia de beta galactosidasa que se refleja en la intolerancia a la lactosa.

4. Enzimas en procesos analíticos.

Debido a su especificidad, las enzimas son apropiadas para medir compuestos individuales de plantas y animales. Generalmente no es necesario tener un grado alto de pureza de los compuestos antes de que sean cuantitativamente determinados. Un ejemplo claro es la determinación de glucosa, la cual se puede hacer por medios químicos empleando soluciones de cobre, ácido 3,5 dinitrosalicílico y otros, teniéndose la desventaja de no poder distinguir entre glucosa y otros productos reductores. La acción de glucosaoxidasa sobre glucosa se combina con determinaciones colorimétricas del peróxido de hidrógeno producido por el uso de peroxidasa y sirve para determinar los microgramos de glucosa en pocos minutos.

También se puede determinar la glucosa por medio de glucosaoxidasa inmovilizada en una columna de gel de poli--acrilamida, analizando el decremento de la tensión de oxígeno.

debida a la acción de la enzima por medio de electrodos sensitivos al oxígeno. La enzima inmovilizada puede ser usada repetidas veces, lo que disminuye su costo. (2, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 17, 27, 33, 43, 52, 59, 64, 69, 76, 78, 80, 83, 86, 87, 90, 91,92,).

OBJETIVO

El alumno realizará las siguientes aplicaciones en alimentos:

1. Aplicará una enzima comercial proporcionada por el profesor.
2. Aplicará una enzima inducida, obtenida en el laboratorio.
3. Inhibirá una enzima presente en un alimento para evitar reacciones indeseables en el mismo.
4. Activará una enzima presente en un alimento para proporcionarle al mismo, alguna característica deseable.
5. Medirá el contenido enzimático en algún proceso para dar un índice de efectividad del mismo.

Esta práctica se realizará en cinco etapas.

FUNDAMENTO

La práctica se basa en la aplicación de todos los conocimientos adquiridos por el alumno en las prácticas anteriores, para obtener una mejora en un alimento dado, por medio de la aplicación, activación, inhibición o medición del contenido de enzimas en el mismo, tomando en cuenta todos los factores que afectan la actividad de las enzimas y su aplicación en la Industria Alimentaria.

PROCEDIMIENTO.

1. Seleccionar el tipo de alimento en el que se aplicará la enzima comercial proporcionada por el profesor. Esta selección se hará en base al tipo de enzima del que se trate (proteasa, lipasa, carbohidrasa, etc).
2. Elaborar el alimento seleccionado.
3. Siguiendo el método adecuado, adicionar la enzima (de 100 a 500mg), a parte del alimento, dejando como testigo otra parte del alimento al que no se le adicionará la enzima.
4. Observar y comparar los resultados en el alimento con y sin enzima.
5. Repetir la operación con la enzima obtenida en el laboratorio por inducción microbiana.

- Inhibición de enzimas presentes en alimentos

1. Seleccionar el tipo de alimento al que se le inhibirá alguna enzima para proporcionarle una característica deseable.

2. Elaborar el producto y añadir el inhibidor seleccionado a la mitad del mismo, dejando como testigo la o -tra mitad. (Tomar en cuenta que el inhibidor seleccionado deberá estar permitido para los alimentos y no podrá ser tóxi-co, así como seleccionar correctamente las condiciones del experimento).

3. Después de elaborado el producto, comparar los resultados obtenidos en el alimento que posee el inhibidor y el que no lo posee.

- Activación de enzimas presentes en alimentos.

La prueba de activación de enzimas presentes en los alimentos se hará de manera similar a la de inhibición.

Se sugiere, de ser posible, elaborar pruebas de actividad enzimática para verificar el grado de activación o de inhibición alcanzado.

- Medición de enzimas presentes en alimentos como índice de efectividad de un proceso.

1. Seleccionar el tipo de proceso a verificar y medir la actividad enzimática antes y después de sometido el alimento al proceso. Explicar los resultados obtenidos.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

A. DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS

1. Aplicación de los alimentos de enzimas comerciales e inducidas en el laboratorio.

A. Elaboración del pan: La harina contiene proteasas que reblandecen la masa; pequeñas cantidades de alfa amilasa y gran proporción de beta amilasa. En algunas ocasiones se adiciona amilasa fungal o de *B. subtilis* para elaborar galletas y biscochos. También se utiliza alfa amilasa fungal o malta de trigo o cebada para aumentar el volumen de la hogaza por la conversión del almidón en maltosa que la levadura utiliza generando CO_2 . La alfa amilasa bacteriana, mas resistente al calor, actúa en el horneado provocando un pan blando pero chicloso. La beta amilasa desintegra las dextrinas -- formadas por la alfa amilasa. Las dextrinas contribuyen a las propiedades físicas y de sabor del pan.

El tratamiento enzimático en la panificación produce fermentaciones rápidas, completas y vigorosas; reduce el tiempo de premezclado y se logra éste mas homogéneo; la masa se vuelve menos resistente, mas extensible, menos pegajosa, mas manejable y de mejor sabor y aroma. En los biscochos además, reduce la cantidad de grasa necesaria para su suavidad y baja considerablemente los costos. (43,87).

B. Frutas y Vegetales: Se utilizan enzimas pectinolíticas que hidrolizan y despolimerizan la pectina. Entre sus ventajas se encuentran:

- Incrementan el rendimiento de jugo libre y total, extraen el color del hollejo, evitan el sabor a cocido, facilitan el manejo del flujo para prensarse, extraer el jugo y después clarificarse, en producción de purés y jugos concentrados.

- Se emplean para clarificar jugos (cítricos, manzana, fresas). En el caso de chabacano y durazno, la despectinización ayuda a mejorar la separación del jugo de la fibra rindiendo jugos claros que pueden concentrarse sin la formación del gel. Los jugos de fruta también se enturbian por la presencia de almidón como en el caso de la manzana, pera, etc. Se emplea amilasa y poligalacturonasa microbiana para evitar este efecto y estandarizarlo en otros casos.

- Para evitar la gelatinización de los granos de café, concentrados de limón, jugos de fresa, cereza, etc.

- Para eliminar por completo la pectina presente y estandarizar la adición de la misma, obteniendo una calidad constante en la producción de jaleas.

- En el pelado de cítricos para extraer la piel y sus esencias.

- En tratamientos de turbidez de jugos cítricos de baja concentración, para aumentar la concentración del Brix sin gelificación.

- Eliminación de pectina de verduras para ser deshidratadas o suavizadas y en procesamiento de jugos de verduras. (17,43,78,87).

C. Confitería: Se tienen diversos usos entre los que destacan:

- El uso de renina para elaborar dulces de leche.
- El empleo de invertasa en la elaboración de fondants, caramelos de interior líquido y caramelos macizos así como para evitar la cristalización de la miel de abeja.
- En helados, se emplea la lactasa para evitar la cristalización de la lactosa.
- En la fabricación de jarabes, chocolates, cocoa para recuperar azúcar de los desechos de la industria confitera, en la fabricación de jaleas, se emplean amilasas.
- En la hidrólisis de la pectina que permite recubrir durante la fabricación de dulces que posteriormente se licúan por la presencia de pectinasa fungal.
- El uso de enzimas para hidrolizar la pectina durante la fermentación del cacao. (17,43,87,91).

D. Industria Cervecería: Se emplea amilasa bacteriana, por su estabilidad al calor, en el macerado de los granos de cebada como premalta. La cerveza contiene indicios de almidón que la enturbian y se eliminan con amilasas. También

con el enfriamiento aparece una nebulosidad debida a la interacción de proteínas, carbohidratos y taninos que se elimina con la adición de bromelina, papaína, proteasas fungales y microbianas durante el almacenamiento evitando su precipitación al enfriarse. (5,43,64,87).

E. Fermentación: Entre los principales usos de las enzimas se encuentran:

- En la fabricación de vinos, se incorporan las enzimas pecticas a la fruta triturada, tanques de mosto, cubas de fermentación o en los tanques de vino, para proporcionar aumento en el rendimiento de jugo y vino, al aumentar la capacidad de las prensas continuas y facilitar la filtración. Produce un jugo y vino limpios y clarificados con una estabilidad máxima, disminuyendo el tiempo de proceso. Ayuda en la extracción del color y sabor del hillejo, retienen el sabor fresco y el bouquet y aceleran la sedimentación de borras. Controlan la fermentación.

- En la producción de azúcares fermentables para obtener alcohol, ácido láctico y acético se emplean enzimas de *Acetobacter acetii*. (17,43,87).

F. Productos lácteos:

- En la elaboración de quesos y caseína se emplean renina que produce un coágulo elástico del que se exprime fácilmente el suero. Se puede usar renina con pepsina, ficina, estearasa pregástrica, etc.

- En la elaboración del queso, las enzimas producen características especiales según el tipo de queso del que se trate como por ejemplo: roquefort, cabrales, camambert, gruyere, y otros. (2, 43, 64, 73, 76, 78).

- En la elaboración de hidrolizados de lactosa, se emplea la lactasa. Estos se utilizan para personas con deficiencia de lactasa en el intestino delgado. En la fabricación de helados, se evita la sensación arenosa por la cristalización de la lactosa adicionando lactasa.

- En la elaboración de postres tipo natilla se emplea renina.

- La catalasa se emplea para eliminar el agua oxigenada si se utiliza ésta en la esterilización de la leche.

G. Productos cárnicos: (43,87,91).

- La pancreatina se emplea para hidrolizados de proteínas.

- La papaina, para ablandamiento de carnes.

- La bromelina, en el ablandamiento de envolturas de salchichas y de carne, al igual que proteasas microbianas.

H. Productos medicinales:

La papaina se emplea como auxiliar digestivo, la ficina como antihelmíntico, la glucosa oxidasa como índice de diabetes en la orina, la pancreatina como importante sustancia en la preparación de insulina, la pepsina y hemicelulosa como digestivos. (91).

1. Otros usos: la pepsina se usa para preparar - - peptonas y para recuperar la plata de películas fotográficas usadas. La pancreatina se emplea en curtirudía de pieles junto a la lipasa y papaína. La pancreatina también se usa para producir peptonas para bacteriología.

- En el hilado de fibras, se agrega apresto al almidón gelatinizado para que el hilo sea mas liso y fuerte para el subsiguiente tejido. Antes de teñirlo o antes de mercerizarlo, se elimina el apresto por adición de baño de amilasas y se eliminan éstas por lavado.

- La goma de seda se elimina con papaína o mezclas de enzimas para que la fibrofina de la seda no se ataque por proteasas.

- En la industria papelera, se emplean amilasas para modificar el revestimiento de papeles.

- La amimasa también se usa para reducir la viscosidad de macerados de cereales antes del escaldado.

- La glucosaoxidasa y catalasa se usan para eliminar el oxígeno o la glucosa de la clara de huevo en la producción de mayonesa y de albúmina de huevo.

- La catalasa para eliminar la producción de espuma en la industria hulera y unida a la glucosaoxidasa en alimentos.

- La lipoxidasa en el blanqueo por destrucción oxidante de los carotenoides. (43, 64, 76, 91).

2. Inhibición de enzimas presentes en los alimentos.

Se realiza por medio de sustancias químicas, como el caso de los antioxidantes adicionados para prevenir el obs curecimiento provocado por la presencia de polifenoloxidasas, y por regulación de la temperatura, como en el caso del escal dado de frutas y vegetales, para destruir enzimas que provocan obs curecimiento y sabores desagradables. La eliminación de enzimas que provocan un precipitado de sales cálcicas en jugos de naranja por medio del escal dado es otro ejemplo. En el almacenamiento de alimentos, se emplean bajas temperaturas para mantenerlos frescos durante un tiempo mayor que si no se controlara la misma. También se pueden emplear atmósferas de gas carbónico y nitrógeno en los almacenes de alimentos. (17, 43, 91)

3. Activación de enzimas presentes en los alimentos

Un ejemplo es la activación de amilasa en la produc ción de papas dulces debido a que ayuda en el proceso de cura do proporcionando al producto la textura deseada. En la pro ducción de jugos de manzana y uva, la activación de enzimas péc ticas provoca una clarificación espontánea. En el proceso de malteado, es conveniente la activación de amilasa. Por otra parte, en el momento de cortar la cebolla, se activa --

2. Inhibición de enzimas presentes en los alimentos.

Se realiza por medio de sustancias químicas, como el caso de los antioxidantes adicionados para prevenir el obs curecimiento provocado por la presencia de polifenoloxidasas, y por regulación de la temperatura, como en el caso del escal dado de frutas y vegetales, para destruir enzimas que provocan obs curecimiento y sabores desagradables. La eliminación de enzimas que provocan un precipitado de sales cálcicas en jugos de naranja por medio del escal dado es otro ejemplo. En el almacenamiento de alimentos, se emplean bajas temperaturas para mantenerlos frescos durante un tiempo mayor que si no se controlara la misma. También se pueden emplear atmósferas de gas carbónico y nitrógeno en los almacenes de alimentos. (17, 43, 91)

3. Activación de enzimas presentes en los alimentos

Un ejemplo es la activación de amilasa en la produc ción de papas dulces debido a que ayuda en el proceso de cura do proporcionando al producto la textura deseada. En la pro ducción de jugos de manzana y uva, la activación de enzimas pécticas provoca una clarificación expontánea. En el proceso de malteado, es conveniente la activación de amilasa. Por o tra parte, en el momento de cortar la cebolla, se activa

(ACTIVACION FISICA), la alinasa presente en la misma, contribuyendo a aumentar el sabor del mismo. (17,42,91)

4. Medición del contenido enzimático como índice de un proceso. (2,43,78,91,92)

En éste caso se pueden mencionar, entre otros, la determinación de peroxidasa en frutas y vegetales para encontrar la temperatura óptima de escaldado y como índice de un buen proceso. La determinación de fosfatasa alcalina de la leche como índice de pasteurización y la determinación de invertasa y amilasa como índice de madurez de frutas.

B. DESARROLLO DE LOS MÉTODOS

1. Aplicación a los alimentos de enzimas comerciales e inducidas en el laboratorio.

- Pectinasas (17)

Reactivos:

- Naranjas.
- Solución de pectinasa al 1%
- Benzoato de sodio.

Técnica:

Cortar en pedazos 2-3 kg de naranjas, extraer el jugo y desecharlo. Cortar la piel en piezas de 3 a 5 mm y colocarla en 2 litros de agua hirviendo. Agitar constantemente y

mantener a 90°C durante 10 minutos. Enfriar hasta 45°C. Adicionar 6 ml. de solución al 1% de pectinasa a la mezcla de - incubación a 45°C agitando constantemente. Después de 2 horas de incubación, filtrar la mezcla. El jugo obtenido se pasteuriza inmediatamente (3 min. a 85°C) para inactivar las enzimas. Concentrar el jugo en un baño a 50°C hasta obtener una pasta de 50°Brix aproximadamente. Se puede adicionar 1% de - benzoato de sodio para evitar el crecimiento microbiano.

Resultados:

El extracto obtenido sirve como agente enturbiante y estabilizante de refrescos. Es muy estable y no causa problemas en el producto.

- Invertasa

Reactivos:

- Solución de invertasa al 1%
- Solución de sacarosa al 10%

Técnica:

Verificar la cantidad de sacarosa presente en 100 ml. de solución de sacarosa al 10% por alguno de los métodos conocidos. Agregar 5 y 10 ml. de solución de enzima a sendos matraces que contengan 100 ml. de sacarosa (10%). Incubar a 65-70°C durante 20 minutos. Inactivar la enzima por ebullición. Repetir la operación con un testigo sin enzima y determinar la cantidad de azúcar invertida en el jarabe.

Resultados:

Reportar los datos obtenidos para la inversión con 5, 10 ml. y el testigo. Realizar pruebas organolépticas de los dos jarabes obtenidos y explicar los resultados.

- Amilasa:

Reactivos:

- Solución de alfa amilasa fungal al 1%.
- Jugo de manzana o pera (verde) extraído en el laboratorio.

Técnica:

Realizar pruebas cualitativas de la presencia de almidón en el jugo de manzana o pera. A 100 ml. del jugo, adicionarle 10 ml. de la solución de enzima y mantener a 50°C y pH 4. Inactivar la enzima calentando a 87°C durante 5-7 minutos. Dejar enfriar y determinar cualitativamente la presencia de almidón residual o la ausencia total del mismo. Repetir la operación con un testigo sin enzima.

Resultados:

Se observará la eliminación de turbidez en el jugo debida a la hidrólisis del almidón. Explicar los resultados con bases bioquímicas.

- Proteasa: (87D, 87E)

Reactivos:

- Solución de proteasa bacteriana al 1% pH 7
- Solución de cerveza sin clarificar

Técnicas:

A 100 ml. de la cerveza sin clarificar, llevarlos a 50°C y adicionar 10 ml. de la solución de enzima dejando incubar a dicha temperatura durante 30 minutos aproximadamente o el tiempo necesario para que se forme un precipitado de los sólidos en suspensión presentes en la cerveza sin clarificar. Separar el precipitado formado por medio de filtración o decantación. Llevar la solución clarificada a refrigeración para verificar que no se forma el precipitado. Hacer la prueba con un testigo sin enzima.

Resultados:

Comparar los resultados obtenidos con una cerveza comercial. Reportar los valores organolépticos encontrados en la muestra comercial y la realizada en el laboratorio.

2. Inhibición de enzimas presentes en los alimentos

- Peroxidasa: (74)

Reactivos:

- Solución de guayacol (acuosa) al 2% o al 10% en acetona.

- Solución de agua oxigenada al 10%

Técnica:

Extraer 200 ml. de jugo de manzana. A 5 tubos de ensayo con 2 ml. de jugo de manzana cada uno mantenerlos a temperaturas de 70,75,80,85 y 90°C durante 5 minutos, después de los cuales se añadirán 2 ml. de la solución de guayacol y 5 gotas de agua oxigenada. Los tubos fueron enfriados previamente. Agitar y observar la presencia de coloración parda en algunos de ellos.

Resultados:

La presencia de coloración oscura indica una prueba positiva de peroxidasa. Reportar a que temperatura la prueba es negativa, lo cual indicará la temperatura de escaldado durante 5 minutos. Esta prueba sirve como índice de escaldado y para determinar el tiempo y la temperatura óptimos para éste proceso.

3. Activación de enzimas presentes en los alimentos.

- Lipasa y lipoxigenasa

Reactivos:

- Granos de trigo
- Algodón
- Agua
- Frascos de boca ancha
- Charolas de aluminio.

Técnica:

Colocar los granos de trigo en las charolas humedeciéndolos periódicamente y manteniéndolos a 30°C aproximadamente por un período de tiempo de 4 a 7 días, para activar la lipasa lipoxigenasa y amilasa presentes en ellos. Una vez transcurrido el tiempo de malteado, colocar las charolas en la estufa a 40-50°C durante 1 hora o el tiempo necesario para que se sequen cuidando de que no se quemen. Moler los granos para obtener una harina. Repetir la molienda con granos que no hayan sido previamente germinados los cuales se tomarán como testigo. Debido a la acción de la lipasa sobre los lípidos, la lipoxigenasa sobre el glúten y la amilasa sobre los almidones, se podrá obtener un pan con características de extensibilidad y retención de CO₂ apropiadas, debido al entrecruzamiento de las fibras de glúten. Elaborar un pan con las dos harinas empleando la misma fórmula y las mismas condiciones para ambos .

Resultados:

Comparar la calidad de los panes obtenidos con harina de trigo premalteada y sin maltear. Comentar los resultados.

4. Medición del contenido enzimático como índice -
de un proceso.

- Fosfatasa alcalina de la leche (2,74)

Reactivos:

- Solución de sosa 0,1N
- Solución alcohólica de fenolftaleína al 1%
- Solución amortiguadora de Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH9.65):
Disolver 3.5 g de Na_2CO_3 anh. y 1.5 de NaHCO_3 en agua destilada y llevar a 1 litro en matrâz volumétrico. Ajustar pH.
- Solución de sustrato amortiguado: Disolver 0,5g de fenilfosfato disódico en agua, adicionar 25 ml. de solución amortiguadora y diluir hasta 500 ml. en matrâz volumétrico.
- Reactivo CQC: Disolver 30 mg. de 2,6 dicloroquinona cloroimida en 10 ml de etanol absoluto, guardar en frasco -ambar y en refrigeración; sólo debe abrirse cuando se encuentre a temperatura ambiente para evitar condensación de la humedad.
- Solución catalizadora: disolver 50 mg de sulfato -de cobre en 25 ml. de agua destilada. Colocarla en un frasco gotero.
- Solución de alcohol N butílico neutralizado con NaOH 0,1N. Comprobar su neutralidad agitando 5 ml. de alcohol con 5 ml. de agua y determinar el pH en la fase acuosa.
- Soluciones testigo estables de fenol.

- Leche bronca sin pasteurizar
- Leche pasteurizada.

Técnica:

Rotular 2 tubos de ensayo como leche bronca y 2 tubos como leche pasteurizada. Colocar en cada tubo 5 ml. de solución de substrato amortiguado y 0.5 ml. de la muestra de leche correspondiente. Tapar los tubos con tapón de hule libre de fenol y mezclar sus contenidos por inversión (se corre un blanco sin adicionar leche). Incubar en baño a 40°C durante 20 minutos. Pasado este tiempo, adicionar a cada tubo 10 gotas de reactivo CQC y 4 gotas de la solución catalizadora. Tapar, mezclar por inversión e incubar por 10 minutos o mas a la misma temperatura. Enfriar los tubos con agua corriente hasta temperatura ambiente y adicionar a cada tubo 3 ml. de butanol neutralizado; mezclar bien y dejar separar las fases. Comparar el color desarrollado en la fase butanólica (superior) con la curva patrón para calcular el contenido de fosfatasa en cada muestra.

Correr una curva patrón con soluciones de fenol a diferentes concentraciones repitiendo los mismos pasos que para el problema.

Resultados:

La aparición de color similar a alguna concentración de la curva patrón indica una prueba positiva de fosfatasa alcalina. Comentar los resultados obtenidos para leche bronca y para leche pasteurizada.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué factores hay que tomar en cuenta para decidir si es necesario el uso de una enzima en un alimento de terminado?
2. En la producción de jugo y puré de tomate. ¿Realizaría una activación o una inhibición de las enzimas pécticas? ¿Por qué?
3. ¿Qué tipo de enzima usaría como índice de la vejez en un pescado?
4. ¿Qué uso potencial tiene la celulasa en la Industria Alimentaria?
5. ¿Podría usarse la papaína como índice de madurez en la planta de papaya? ¿Por qué?
6. ¿Podría usarse la determinación de invertasa como índice de madurez en la caña de azúcar?

OBSERVACIONES

Se deben tomar en cuenta todos los factores que afectan a las enzimas y a la calidad del alimento (presencia de activadores e inhibidores, temperatura, pH de actividad y estabilización, así como el tiempo que desea conservar el alimento y el tipo de envase y almacén requerido). También se deben emplear sustancias permitidas para la Industria Alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

17, 29, 33, 43, 59, 72, 73, 74, 76, 79, 80, 83, 86, 87.

D I S C U S I Ó N

V. DISCUSIÓN

El diseño y desarrollo de prácticas para implementarse en el programa de Enzimología, trata de cubrir aspectos generales de los temas que se consideran de importancia en el estudio de cualquier enzima utilizada en la Industria Alimentaria desde el punto de vista didáctico y tecnológico. Para su planeación, se han tomado en cuenta entre otros factores, las teorías y técnicas de enseñanza-aprendizaje; los recursos disponibles en el laboratorio, el tiempo; el contenido de la materia que comprende el estudio analítico de las enzimas, su obtención microbiana y el diseño de sus posibles aplicaciones en la industria.

En el aspecto académico se han considerado los programas de las materias que deberían ser pre-requisitos para la ejecución de las prácticas (principalmente Microbiología, Bioquímica y Fisicoquímica), evitándose la repetición de temas y tomando éstas materias como el nivel inicial para el curso de Enzimología.

En vista de que una buena programación es un factor dinámico que debe periódicamente revisarse, evaluarse y actualizarse en el aspecto científico, se consideró importante la revisión de los cambios realizados al programa en cursos anteriores, manteniéndose en el presente los aspectos po

sitivos y tratando de superar las dificultades surgidas. El presente diseño se ha hecho siguiendo los mismos lineamientos de cursos anteriores.

El grado de complejidad de los temas seleccionados es progresivo. Las prácticas, se distribuyen en tres ciclos: uno de identificación y análisis químico, otro de obtención microbiana y el último de aplicaciones a la industria, de manera que se interese al alumno en el estudio de la materia. Se considera que de ésta forma se cubren aspectos útiles al profesionalista que emplee las enzimas en cualquiera de éstos tres campos. Los conocimientos adquiridos en el primer ciclo y aplicados en el segundo, se reafirman en el tercero donde el alumno agrupa todas sus experiencias.

Los temas seleccionados tienen relación con las industrias que se dediquen a obtener, conservar y estabilizar enzimas, y con las que procesen alimentos en los que sea importante considerar factores de activación, inhibición y adición de enzimas.

Para el mejor trabajo de los alumnos en el laboratorio, se sugiere proporcionarles un folleto de prácticas que conste de la presentación de las mismas; distribución del tiempo durante el semestre; metodología de trabajo semana a semana; cuadros de información general (microorganismos, enzimas

sustratos y aplicaciones), los cuales están hechos sin la información completa para que el alumno se interese por la materia y por la búsqueda del material de ayuda para la ejecución de las prácticas, además de que aprenda a manejar la información de manera concisa y le ayude a estudiar. Por último, las prácticas de laboratorio con sus bases teóricas, objetivos, fundamentos, discusión de técnicas y métodos probables a utilizar, referencias bibliográficas y cuestionarios que servirán para evaluar el trabajo realizado por el alumno completarían el folleto sugerido.

Se considera importante que el alumno conozca de antemano los objetivos, el trabajo a realizar y el contenido de la materia para organizarse de acuerdo al programa establecido.

El método sugerido es trabajar en equipo con discusiones periódicas en las que se resuelvan dudas y se organice el trabajo posterior para que el alumno aplique su criterio en el desarrollo de las prácticas con la asesoría y apoyo de su profesor; de éste modo, se conocen en realidad los problemas que se le plantean al estudiante en el desarrollo del programa y se puede brindar una asesoría eficiente tanto de conocimientos como de distribución del tiempo para efectuar las prácticas.

Sería de utilidad la elaboración de tablas de resultados de todos los equipos para hacer comparaciones en cada sesión de clases.

Se sugieren métodos de evaluación de los alumnos - por medio de discusiones, observación del trabajo en el laboratorio, reportes, exámen escrito y oral, así como la evaluación del programa por medio de pruebas con grupos piloto analizando todos los factores que afectan el buen funcionamiento del mismo.

Por último se sugiere realizar visitas a industrias proyectar películas y otras actividades similares de temas relacionados con la Enzimología.

C O N C L U S I O N E S

VI. CONCLUSIONES

Algunas de las desventajas que se observan en éste-trabajo y que pueden ser mejoradas se dan a continuación:

El estudio de las enzimas, se enfoca de una manera cualitativa debido al poco tiempo del que se dispone en el se mestre, a la escacés de equipo de laboratorio y a que el alum no tiene su tiempo saturado por el trabajo de otras materias. Un programa con demasiadas pruebas cuantitativas implicaría mayor dedicación y abandono de otros estudios.

Otra desventaja es que no se ha podido adaptar la obtención de enzimas vegetales y animales al laboratorio por las dificultades que se tienen en su extracción ya que las ve getales dependen de épocas de cosecha y zonas productoras, y las animales, necesitan sistemas de refrigeración para mante- ner la actividad enzimática en la víscera durante su transpor- te desde el rastro hasta el laboratorio. Esto se trató de su- perar considerando el estudio de enzimas de origen animal y vegetal, proporcionadas por casas comerciales. De ésta mane- ra, el alumno las conoce y aprende a analizarlas aunque no las pueda extraer en el laboratorio.

Algunos temas como los de purificación y estabilizau

ción de enzimas no se pueden tocar con más profundidad por el momento ya que los materiales necesarios para la elaboración de éstas prácticas son caros, aunque se considera, que haciéndo investigaciones, se pueden encontrar y aplicar otros métodos y materiales de menor costo.

La identificación de enzimas por su origen es otro de los temas de interés que no se toca en éste programa y que puede ser de gran importancia para detectar adulteraciones en enzimas comerciales.

Es importante aumentar los ejemplos de análisis realizados en la industria ya que van a servir para la formación del profesionista.

El número de prácticas seleccionado y el tiempo empleado en cada una de ellas, se ha tratado de distribuir de manera homogénea y se consideran existentes las condiciones favorables para su realización en un semestre; aunque muchas de ellas no fueron probadas completamente en el laboratorio por que ésto implicaba por un lado mucho tiempo invertido y por otro los resultados no serían los mismos que cuando se realizaran con alumnos, se hace notar la gran importancia de poner a prueba en un grupo piloto, las prácticas sugeridas y realizar los ajustes necesarios antes de implementarlas al programa para así poder evaluar los resultados reales.

Para diseñar y desarrollar las prácticas, se asistió a un Curso de Didáctica General, impartido por la Licenciada Pilar Rodríguez Muñoz de Cote, en el Centro de Investigaciones y Servicios Educativos (CISE), de la U.N.A.M. y a un Curso de Enzimas Importantes en la Tecnología de Alimentos, impartido por el Dr. John R. Withaker en el Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N.

Por otra parte, se solicitó en casas comerciales, muestras e información de enzimas, todo lo cuál fué donado al Laboratorio del Area de Alimentos de la Facultad de Química de la U.N.A.M. para que sirva de material de apoyo en el desarrollo de las Prácticas de Enzimología Aplicada a los Alimentos.

La revisión de programas de materias científicas, debe contemplar su actualización y la aplicación de nuevos métodos y técnicas para lograr el propósito de la enseñanza superior: formar individuos con ética profesional y capacidad para resolver los problemas de la Industria.

B I B L I O G R A F I A

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre Lora, M.E., Arredondo Galván, M., Pérez Rivera, G. MANUAL DE DIDÁCTICA GENERAL, CURSO INTRODUCTORIO, PROGRAMA NACIONAL DE FORMACIÓN DE PROFESORES, A.N.U.I.E.S., Impresiones Kuality, D.F. 1972. 1ra Edición. 1978. 5ta Reimpresión.
2. Alais, Charles. CIENCIA DE LA LECHE, PRINCIPIOS DE TÉCNICA LECHERA. Compañía Editorial Continental. España. 1970. 1ra Edición en Español de la 2da Edición Francesa 1971. 1ra Reimpresión. pp. 66,98,100,103-126,163-169, 210,215,508,533,570.
3. Anthón, Rya. CHEMICAL MICROBIOLOGY. Butterworths. 2th. Edition. London. 1968.
4. Association of Official Agricultural Chemists (A.O.A.C.) Official Methods of Analysis. Washintong, D.C. U.S.A. 1970.
5. Avila Gonzales, J., García Currielche, F. EFFECTO DE DIVERSOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA ESTABILIZACIÓN DE LA CERVEZA. TESIS. 1977. Facultad de Química, U.N.A.M.
6. Béhar, M., Icasa, S.J., NUTRICIÓN. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México 1972. 1ra Edición.
7. Bender, M.L. and Brubacher, L.J., CATALYSIS AND ENZYME ACCIÓN. Mc. Graw Hill. New York. 1973.
8. Bergmeyer, H.U., METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS. Academic Press. New York 1963 (4 Vol.) 1974. 2th Edition.
9. Best Guzmán, E. y Hernández Sandoval, S.A., PRODUCCIÓN DE PECTINASA Y PROTEASA POR A. NIGER. TESIS. 1978. Facultad de Química, U.N.A.M.
10. Biochemistry Series One. M.T.P. International. Review of Science. Consultants Editors Hilkornberg FRS. D.C. Philips FRS. Volume 4,5,7. 1974.
11. Blanco Labra, E. NIVELES DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS EN LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ. TESIS. 1978. Facultad de Química, U.N.A.M.
12. Bloch, Konrad. LIPIDE METABOLISM. John Wiley. New York, London. Department of Chemistry. Harvard University. 1960
13. Boyer, P.D. THE ENZYMES. New York. 1970. Student Edition. Academic Press. Third Edition. Volume I, II, III.

14. Boyer, P.D. Lardy, H. and Myrbäck, K. THE ENZYMES. Academic Press, New York. 1959. 2th Edition.
15. Breed, S. Roberth. Murray E.C.D. , Parker, A. BERGEY'S - MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. The Williams & Wilkins Co. 1948. Baltimore U.S.A. 6th Ed. pp 704.
16. CATALOGO DE ENZIMAS PARA FARMACIA Y PRODUCTOS ALIMENTICIOS. Merck. 1978. (donado al Lab. 202 Facultad de Química, U.N.A.M.)
17. CATALOGOS: ULTRAZYM 100 JUGOS, ULTRAZYM 100 VINOS, ULTRAZYM 100 CAFE, IRGAZYM. Ciba-Geigy. División Agropecuaria Productos Biotécnicos. 1978. (donado al Lab. 202 Facultad de Química U.N.A.M.)
18. Chen, B.J. Kolorik. M.J. Emery, A.H. and Lin, H.C. IMMOBILIZED ENZYMES IN FOOD AND MICROBIOL PROCESSED. Cooney C.L. and Olson, A.C. Plenum Press. 1974.
19. Collowick, S.P. and Kaplan, N.O. METHODS IN ENZYMOLOGY Academic Press, New York and London, 1972. Volume 1, 2, 3, 11, 45.
20. Conn, E.E. y Stumpf, P.K. BIOQUIMICA FUNDAMENTAL. Editorial Limusa, México. 1976. 3ra Edición 1978. 2da Reimpresión, pp. 15, 274.
21. Cook, A.H. THE CHEMISTRY AND BIOLOGY OF YEAST. Academic Press, Inc. Publisher, New York 1958. Chap 6, 7.
22. Cooney, C.L. and Olson, A.C. IMMOBILIZED ENZYMES IN FOOD AND MICROBIAL PROCESSED. Plenum, New York. 1973.
23. Cruz Parra, R.J. ESTUDIO COMPARATIVO DE SACCHAROMYCES CARLBERGENSIS CON CANDIDA YITLIS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOMASA. TESIS. 1977. Facultad de Química, U.N.A.M.
24. Desnuelle, P. PANCREATIC LIPASE. Advance in Enzymology. 23: 129 (1961).
25. Dixon, M. and Weeb, E.C. ENZYMES. Longmans Green and Company, L.T.D. London. 1964. 2th. Edition. 1965. 4th Impression.
26. Escalante, J.P. Pérez Gavilán. ESTUDIO DE LA MODIFICACION QUIMICA DE LA PAPAINA CON LA N-BROMOSUCCINIMIDA Y SU EFECTO EN LA ACTIVIDAD. TESIS. 1972. Facultad de Química, U.N.A.M.

27. Flores Lechuga, A.L., Vázquez Casillas, T. de G. PRODUCCION DE ENZIMAS CELULOLITICAS MEDIANTE EL EMPLEO DE TRICHODERMA VIRIDE. TESIS. 1978. Facultad de Química. U.N.A.M.
28. Farr, A.L. Lowry, O.H. Randall, R.J. and Rosebrog, N.J. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. J. BIOL. CHEM. Baltimore 2. U.S.A. 193:265 (1951).
29. Fraizier, W.C. MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 1976. 2da Edición. 1ra Reimpresión. 1ra Parte, pp 13-70 4ta Parte pp 361-405.
30. Gaden, Elmer L. SYMPOSIUM OF ENZYMATIC CONVERSION OF CELLULOSIC MATHERTIALS. Published in cooperation with The National Acadey of Sciences by John Wiley. New York, 1976.
31. Garrido Niembro, M.N. ESTUDIO CINÉTICO DE ALGUNAS ENZIMAS INDUCIBLES. TESIS. 1969. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Femenina.
32. Gerstein, J.W. DICTIONARY OF MICROBIOLOGY. D. Von Nostrand Company, Inc. Princeton New Jersey. 1957.
33. Gilbón Acevedo, A. INMOVILIZACIÓN DE GLUCOSA ISOMERASA Y SU UTILIZACION EN LA CONVERSION CONTINUA DE D-GLUCOSA A D-FRUCTOSA. TESIS. 1978. Facultad de Química, U.N.A.M.
34. Gunsalus, I.C. and Stainer, R.Y. THE BACTERIA A TEATRICE ON STRUCTURE AND FUNCTION. Academic Press. New York and London. 1960. Volume I, III, IV.
35. Harow, B. Manzur, A. TEXTBOOK OF BIOCHEMISTRY. M.B. Saunders Co. 1973. 7th. Edition.
36. Harrison and Rose. THE YEAST. Academic Press. New York 1969. Volume I, II, III.
37. Honig, P. PRINCIPIOS DE TECNOLOGÍA AZUCARERA. Editorial Continental. México, D.F. 1974. Tomo 1, 2, 3.
38. Iturbe Chiñas, F.A. ESTUDIO DE INHIBIDORES DE AMILASA EN GRANOS DE MAIZ. TESIS. 1976. Facultad de Química, U.N.A.M.
39. Jamer, M. PROTEOLITIC ACTIVITY OF PAPAINE. Bull. Agr. 42: 931-71 (1961).
40. Jencks, W.P. CATALYSYS IN CHEMICAL ENZIMOLOGY. Mc. Graw Hill. New York. 1969.

41. Jeørgensen, A.P. MICROBIOLOGÍA DE LAS FERMENTACIONES INDUSTRIALES. Editorial Acribia, Zaragoza España. 1959. 7ma. Edición.
42. Kemp, J.E. PLANEAMIENTO DIDACTICO. PLAN DE DESARROLLO PARA UNIDADES Y CURSOS. Editorial Diana. México. 1972. 1ra. Edición.
43. Kirk-Othemer. ENCICLOPEDIA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA. Editorial U.T.H.E.A. Madrid, España. 1970. Vol. 6.
44. Kretzschmar, Hermann. LEVADURAS Y ALCOHOLES. Editorial Reverté, S.A. Barcelona 1961. Versión Española.
45. Kunitz, M.Z. CRISTALLINE SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR. J.G.PHISIOLOG. Waverly Press Inc. U.S.A. 30:291(1947)
46. Kunitz, M.Z. and Northrop, J.A. CRISTALLINE TRYPSIN. J.G.PHISIOLOG. Waverly Press Inc. U.S.A. 16:316-318(1932)
47. Labansat, Valdés, E. DISEÑO Y PREPARACION DE UNA COLUMNA DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD PARA LA PURIFICACION DE LAS DISTINTAS FORMAS DE AMILASAS. TESIS. 1975. Facultad de Química, U.N.A.M.
48. Laindler, K.J. INTRODUCTION TO THE CHEMISTRY OF ENZYMES. Mc. Graw Hill, New York, 1954.
49. Larroyo, Francisco. PEDAGOGIA DE LA ENSEÑANZA SUPERIOR. Editorial Porrúa. México. 1964. 2da. Edición.
50. Lazo- Wesen, Edgar, A. STANDARIZATION OF PAPAINE ACTIVITY. J. PH. SCIENCE. Easton, Pa., U.S.A. 55(7) 723-25 (1966).
51. Lehninger, A.I. BIOCHEMISTRY. Worths Publisher, Inc. New York 1975. 2th. Edition.
52. Lemuel, B. and Wingard, Jr. ENZYMES ENGINEERING. Interscience Publisher, New York. 1972.
53. Litwack, G. EXPERIMENTAL BIOCHEMISTRY. John Wiley and Sons, Inc. New York, 1960.
54. Mackly, A.C. METHODS IN ENZYMOLOGY. Academic Press. New York. Volume 2.
55. MANUAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS. Society of American Bacteriologist. Mc. Graw Hill Co. 1957.

56. Manzanilla Cadenas, C.A. SUBSTITUCIÓN DE ACETONA POR ALCOHOL ETÍLICO EN LA OBTENCIÓN DE BROMELINA A PARTIR DE DESPERDICIOS DE PINA. TESIS. 1977. Facultad de Química, U.N.A.M.
57. Maron y Prutton. FUNDAMENTOS DE FISICOQUIMICA. Editorial Limusa, México. 1968. 1ra. Edición. 1973. 5ta - Reimpresión.
58. Martínez Luna, M.N. CONTROL DE CALIDAD DE LA PAPAINA. TESIS. 1971. Facultad de Química, U.N.A.M.
59. Martínez Montoya, S. OBTENCIÓN DE LA MALTODEXTRINA COMO UN PRODUCTO DE UNA REACCIÓN ENZIMÁTICA SOBRE LA FECULA DE MAÍZ Y SU IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. TESIS. 1974. Facultad de Química, U.N.A.M. A
60. Mc. Kenzie LA ENSEÑANZA Y EL APRENDIZAJE. Editorial Septiembre 70. México, 1974.
61. Mertz, Edwin, T. BIOQUÍMICA. Publicaciones Cultural, S.A. México 1971. 1ra Edición en Español. 1971. 1ra Reimpresión. Capítulos: 3,4,5,6,10,11.
62. Meyer, L.H. FOOD CHEMISTRY. The AVI Publishing. Co., Inc. Westport Connecticut. 1975. Reprinted.
63. MICROBIAL ENZYME PRODUCTION. Libro de Patentes (copias fotostáticas sin datos donadas al Lab. 202 Facultad de Química, U.N.A.M.)
64. Mier Ochoa, G.R. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS. MONOGRAFÍA. 1970. Facultad de Química, U.N.A.M.
65. Moreno Añorve, L. ACTIVIDADES DE BETA GLUCANASA DE MALTA DE CEBADA EN SUSTRATO NATURAL Y EN LAMINARINA. TESIS. 1975. Facultad de Química U.N.A.M.
66. Natisk and Newton. SYMPOSIUM ON ENZYMATIC CONVERSION OF CELLULOSIC MATHERIALS. Massachusetts. 1975.
67. Neilands, J.B. and. Stumpf, P.K. OUTLINES OF ENZYME CHEMISTRY. John Wiley & Sons. Inc. , New York 1958. 2th Ed.
68. Nelson, N.J. COLORIMETRIC DETERMINATION OF AMILASE. BIOL. CHEM. 15: 375 (1944).
69. Ochoa, J.L. IDENTIFICACION Y PROPIEDADES GENERALES DE LAS GLUCOSIDASAS DE LA SEMILLA DE LA YUCCA FILIFERA. TESIS. 1975. Facultad de Química, U.N.A.M.

70. Palmade, Guy. LOS MÉTODOS EN PEDAGOGÍA. Editorial Paidós. Buenos Aires, Argentina. 1964.
71. Pérez, A.R. y Verde C.R. PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES. TESIS. 1978. Facultad de Química, U.N.A.M.
72. Peschard Mariscal, E.A. ESTUDIO DE LA MODIFICACION QUÍMICA DE LA PAPAÍNA CON EL REACTIVO 2-HIDROXI, 5-NITRO BROMOBENCENILO. TESIS. 1974. Facultad de Química U.N.A.M.
73. Potter, N.N. LA CIENCIA DE LOS ALIMENTOS. Edutex, S.A México, D.F. 1973. 1ra Edición en Español de la 2da. Edición en Inglés. (1970). pp. 11,56,58,59,149,340,444, 533,618.
74. PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS, BIOQUÍMICA (I y II), FÍSICOQUÍMICA FARMACÉUTICA, MICROBIOLOGÍA GENERAL Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (I). Facultad de Química U.N.A.M. 1976.
75. Prescott, S.C. MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL. Editial Aguilar. Madrid España. 1962.
76. PRODUCTION AND APLICATION OF ENZYME PREPARATIONS IN FOOD MANUFACTURE. SCI. MONOGRAPH. 11. Society of Chemical Industria. London. 1961.
77. PROGRAMAS DE BIOQUÍMICA, FÍSICOQUÍMICA FARMACÉUTICA, Y MICROBIOLOGÍA GENERAL. Carrera de Q.F.B. Facultad de Química. U.N.A.M. 1978.
78. Reed, J. ENZYMES IN FOOD PROCESSING. Academic Press. New York. 1966. 1th. Edition. 1975. 2th Edition.
79. Romano Hasan, E. Rubio Ceseña, C.E. INVESTIGACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA Y LOS ABLANDADORES DE CARNES EN LAS REACCIONES DE INMUNOPRECIPITACION PARA IDENTIFICACION DE LAS ESPECIES. TESIS. 1976. Facultad de Química. U.N.A.M.
80. Sagaón Riojas, M.C. LAS ENZIMAS EN LA INDUSTRIA DE LA PANIFICACION. MONOGRAFIA. 1970. Facultad de Química U.N.A.M.
81. Salle, A.J., B.S., M.S. FUNDAMENTAL PRINCIPLES OF BACTERIOLOGY. Mc. Graw-Hill Books Co., Inc. New York Toronto, London. 1954. 4th. Edition.

82. Salle, A.J. LABORATORY MANUAL ON FUNDAMENTAL PRINCIPLES OF BACTERIOLOGY. Mc. Graw-Hill Books Co. 5th Edition. 1973
83. Schultz, H.W. FOOD ENZYMES. THE FRIST OF A SERIES OF - - SYMPOSIA ON FOOD HELD OF OREGON STATE COLLEGE. The Avi. Publishing. 1959.
84. Solomons, G. MATHERIALS AND METHODS IN FERMENTATION. - - Academic Press. New York. 1964.
85. Trejo Burgueño, M.M. PRODUCCION PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE ALFA AMILASA DE ASPERGILLUS ORIZAE COMPARADA CON ALFA AMILASA COMERCIAL DE BACILLUS SUBTILIS. TESIS. 1976. Facultad de Química, U.N.A.M.
86. Valcarcel Arjona, M.P. CLARIFICACION DE VINOS. TESIS. 1971. Facultad de Química, U.N.A.M.
- 87A Velasco Fernández, J.G. REVISTA TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Editorial Ciencia y Tecnología, S.A. LAS PECTINASAS EN LA ELABORACION INDUSTRIAL DE JUGOS FRUTALES Y SUS DERIVADOS. Volúmen 3 (mayo- junio) 1968. México.
- 87B Velasco Fernández, J.G. EL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO EN LA PANIFICACION. Tecnología de Alimentos. Editorial - Ciencia y Tecnología, S.A. México. Volúmen 4 No. 1 - 1969.
- 87C Velasco Fernández, J.G. LOS BIOCATALIZADORES ENZIMÁTICOS Revista Tecnología de Alimentos. Editorial Ciencia y Tecnología, S.A. México. Volúmen 5 No. 6 1970.
- 87D Velasco Fernández, J.G. LA FABRICACION DE LA CERVEZA 1ra PARTE. Revista Tecnología de Alimentos. Editorial - Ciencia y Tecnología, S.A. México. Año 8. No. 3 1973.
- 87E Velasco Fernández, J.G. LA FABRICACION DE LA CERVEZA 2da Parte. Revista Tecnología de Alimentos. Editorial Ciencia y Tecnología, S.A. México Año 8. No. 4 1973.
- 87F Velasco Fernández, J.G. ENSAYOS CON ENZIMAS EN PROCESOS DE PANIFICACION. Revista Tecnología de Alimentos Editorial Ciencia y Tecnología, S.A. México. Año 9 No. 1. 1974.
88. Vos del Sol, E.E. ORGANIZACION ACADEMICA. FACULTAD DE QUIMICA, U.N.A.M. SECRETARIA DE RECTORIA. DIRECCION GENERAL DE ORIENTACION VOCACIONAL. 1978-79.
89. Weeb, J.L. ENZYME AND METABOLIC INHIBITORS. Academic Press. New York. 1963.

90. Whitaker, J.R. FOOD RELATED ENZYMES. American Chemical Society, Washington, D.C. 1974. Advances in Chemistry Series, 136.
91. Witaker, J.R. PRINCIPLES OF ENZYMOLOGY FOR THE FOOD SCIENCES. Marcel Dekker, Inc. New York. 1972. Food Science A. Series of Monographs Vol. 2.
92. White, A. Handler, P. Smith, E. PRINCIPLES OF BIO-CHEMISTRY Mc. Graw-Hill Books Co. New York 1974.
93. Wynn, C.H. THE STRUCTURE AND FUNCTION OF ENZYMES. E. Arnold. London. 1973.