

1
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

FALLA DE ORIGEN

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
EN MICROENCAPSULADOS UTILIZADOS EN
DETERGENTES BIOLOGICOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q U I M I C O
P R E S E N T A :
ARTURO BRAVO PALAFOX

Director de Tesis: Q.F.I. GILDA FLORES ROSALES





Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE

I.	INTRODUCCION	1
II.	OBJETIVOS	3
III.	HIPOTESIS	5
IV.	GENERALIDADES	7
V.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	28
VI.	RESULTADOS Y DISCUSION	41
VII.	CONCLUSIONES	86
VIII.	BIBLIOGRAFIA	88

INTRODUCCION

Un detergente es una sustancia sintética que reduce la tensión superficial del agua en que se disuelve y por ello facilita el lavado y la limpieza de los objetos. Los primeros que desarrollaron los "jabones sintéticos" o detergentes fueron los alemanes durante la Primera Guerra Mundial. Se componían de sulfonatos de alquil-naftaleno de cadena corta los cuales son buenos agentes humectantes pero malos en acción detergente. Este hecho inició el interés mundial por el desarrollo de detergentes y en la actualidad se continúa con este tipo de estudios. Originalmente los detergentes eran compuestos de cadena corta y sulfatos alcohólicos de cadena larga (años cuarenta), después consistían en compuestos de cadena ramificada de las siguientes dos décadas. Durante la década de 1950 surge la necesidad de producir detergentes biodegradables, lo que provocó el regreso a las cadenas lineales, ya que sólo este tipo de cadenas se pueden biodegradar fácilmente, además a finales de esta misma década una compañía muy importante llamada PROCTER & GAMBLE introduce en el Continente Americano detergentes enzimáticos o biológicos que ya eran muy comunes en Europa años atrás.

Los detergentes biológicos presentan en su formulación, además del agente tensoactivo, microencapsulados los cuales contienen enzimas degradativas, éstas descomponen o alteran la composición de la suciedad (lípidos, almidones y proteínas) y hacen que las partículas se puedan eliminar más fácilmente.

II
OBJETIVOS

- 1.- Comprobar la actividad enzimática de **PROTEASAS** y **ALFA-AMILASAS** presentes en microencapsulados utilizados en detergentes biológicos en condiciones de laboratorio y de utilización doméstica.
- 2.- Realizar la Cinética Enzimática de éstas enzimas en condiciones de utilización.

III
HIPOTESIS

- Los microencapsulados utilizados en detergentes biológicos tienen actividad enzimática en condiciones de utilización.

IV
GENERALIDADES

A) DETERGENTES.

Los detergentes difieren de los jabones por su modo de actuar con aguas duras; los jabones forman compuestos insolubles con los iones calcio y magnesio presentes en ésta, los cuales reducen las acciones espumante y limpiadora mientras que los detergentes pueden reaccionar con los iones del agua dura, pero los productos resultantes son solubles y/o permanecen dispersos en forma coloidal en el agua.

Las propiedades tensoactivas del detergente hacen que el agua se adhiera más íntimamente a la suciedad fijada en la ropa, la vajilla u otras cosas, que despegue sus partículas y forme una emulsión que las mantiene en suspensión en el agua.

Los detergentes son básicamente sulfonatos que se obtienen --tratando derivados del petróleo con ácido sulfúrico. Dado el uso --que se destina al detergente, se adopta determinado sulfonato y se combina con otros ingredientes dotados de propiedades particulares como son: el trifosfato sódico y la carboximetil celulosa que dispersan las partículas de suciedad, los antiespumantes evitan la --formación de un exceso de espuma, el perborato de sosa procura un --blanqueo que puede ser acentuado por un ligero colorante azul, etc.

Las moléculas de los detergentes tienen grupos afines al agua (hidrofilicos) en un extremo y grupos repelentes al agua (hidrofóbicos) en el otro. Estas propiedades especiales son importantes para la eliminación de manchas la cual se logra por medio de la humectación, emulsificación y dispersión por el agente limpiador. Para que esto suceda las moléculas de detergente se pueden agregar --en agua en racimos esféricos llamados micelas (FIGURA 1). La parte no polar de las moléculas se reúnen en el interior de la micela y el grupo polar en el exterior.

Los compuestos solubles en aceite pero insolubles en agua, con frecuencia se disuelven en el centro de la micela atraídos por los grupos de hidrocarburos (parte no polar), a este proceso se le conoce como solubilización.²³

El agente limpiador de los detergentes es conocido como surfactante o agente tensoactivo y comprende "cualquier compuesto que afecta (generalmente reduce) la tensión superficial al disolverse en agua o en soluciones acuosas, o que de modo similar afecta la tensión interfacial entre dos líquidos. El jabón es un material de este tipo, pero el término se aplica con más frecuencia a los derivados orgánicos como las sales sódicas de sulfatos o sulfonatos de alto peso molecular".²²

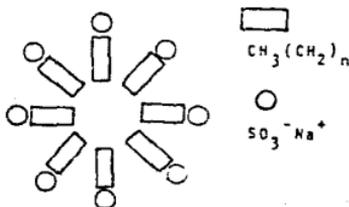


FIGURA 1.
ESQUEMA DE UNA MICELA

Los surfactantes de detergentes realizan la principal acción de limpieza durante el lavado, por medio de la reducción de la tensión superficial. El proceso de limpieza consiste en:

- 1) Humectación de la suciedad y de la superficie del material que va a lavarse con la solución detergente.
- 2) Eliminación de la suciedad de la superficie.
- 3) Lograr que la suciedad permanezca en una solución estable o en una suspensión (detergencia).

En el agua de lavado, los detergentes aumentan la capacidad humectante del agua para que pueda penetrar más fácilmente por todo el material, alcance a la suciedad y de esta forma empiece a eliminarla. Cada molécula de la solución limpiadora se puede consi

derar de cadena larga, una terminal de la cadena es hidrofílica; la otra es hidrofóbica y esta última muestra afinidad por la suciedad que se va a eliminar. Las terminales hidrofóbicas de algunas de estas moléculas son atraídas a una partícula de mugre y la rodean, al mismo tiempo las terminales hidrofílicas separan las moléculas y partículas de mugre del material que se está lavando hacia el agua de lavado, esta es la acción que al combinarse con la agitación mecánica del lavado, hace capaz a un detergente de eliminar la suciedad, suspendiéndola y evitando que se deposite nuevamente en el material.

Los detergentes se clasifican en cuatro grupos principales según el grupo hidrofílico que presenta éste:

- Aniónicos: sulfonatos ($-\text{SO}_3\text{H}$).
- Catiónicos: aminas ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, $-\text{C}_5\text{H}_5\text{N}^+$).
- No iónicos: alcoholes ($-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$).
- Anfotéricos: contienen grupos catiónicos y aniónicos.

En muchos casos la porción hidrofóbica es un hidrocarburo que contiene de 8 a 18 átomos de carbono en una cadena lineal o ligeramente ramificada.

Los principales componentes de un detergente son:

- Agentes tensoactivos.
- Zeolitas.
- Coadyuvantes alcalinos.
- Blanqueadores.
- Agentes que impiden la redeposición.
- Perfumes.
- Modificadores de espuma.

En los últimos años se han introducido al mercado los detergentes biológicos, los cuales, contienen además de todos los compuestos mencionados enzimas degradativas que eliminan biológicamente la suciedad del material, proporcionando una mayor eficacia en el lavado.¹⁸

Para este estudio la importancia del comportamiento enzimático para el efecto del lavado, es la propiedad más importante de un detergente, pero además cabe mencionar también las siguientes propiedades de los detergentes biológicos:¹⁹

- 1) Estabilidad de almacenaje.- Aseguran una estabilidad debido a que las enzimas están perfectamente protegidas dentro de los microencapsulados, evitando así cualquier daño del medio ambiente.
- 2) Segregación.- Las partículas de granulado T ("Tough" resistente) o microencapsulados, son más o menos esféricas con un diámetro medio de unos 550 micrones, forma y dimensión que aseguran un mínimo de segregación, es decir, los granulados no se separarán de la mezcla.
- 3) Solubilidad.- Los microencapsulados son fácilmente solubles en las soluciones deterativas, resultando que la actividad enzimática se presenta en unos pocos minutos, aún a temperaturas muy bajas.
- 4) Contenido en polvo.- Los granulados T están casi libres de polvo y las partículas de granulado tienen una resistencia muy alta de trituración, por lo tanto, el nivel de polvo enzimático que puede ser nocivo para la salud se mantiene muy bajo.

B) MICROENCAPSULADOS.

Los microencapsulados o granulados T ("Tough" = resistente) - son partículas esféricas de color gris claro, con un diámetro medio de alrededor de 550-600 micrómetros y una densidad de 0.8-1.1 g/cm³.¹⁹

Los granulados T contienen enzimas degradativas con diferentes actividades enzimáticas, éstos pueden ser productos unienzimáticos o mezclas de dos o más enzimas.

Los microencapsulados consisten en un núcleo con contenido enzimático, recubierto por una capa de revestimiento. Además de la enzima, el núcleo contiene sales inorgánicas, aglutinantes y fibras celulósicas, que proporcionan al granulado resistencia. El núcleo está revestido por una capa inerte de cera y pigmento para ajustar el color y aseguración durante el manejo.^{17,19}

Los microencapsulados se mezclan fácilmente en los detergentes en polvo, quedando la enzima activa eficazmente protegida de la acción de los componentes desensivos durante el almacenamiento. El granulado se disuelve rápidamente en las soluciones desensivas.

Los microencapsulados se utilizan con gran éxito en muchos tipos de detergentes, tanto para lavado doméstico como para lavado industrial, también en detergentes de prelavado y en los de utilidad general.

Las enzimas que contienen estos granulados son estables y activas en condiciones alcalinas y pueden utilizarse en un intervalo amplio de temperaturas. Esto significa que son activas durante la mayor parte del ciclo de lavado.

Otro factor importante es la eficacia de las enzimas junto con los principales componentes del detergente. Algunos agentes causan en la enzima un efecto reducido, bien desactivando ésta o bien modificando las proteínas, de tal manera que ya no puedan hidrolizarse mediante la enzima; son ejemplos de tales agentes el formaldehído y los compuestos que desprenden cloro. Cuando resulta esencial usar estos compuestos, el mejor resultado se obtendrá en

un proceso en dos etapas, siendo el tratamiento enzimático la primera etapa.¹⁷

En el mercado nacional existen los siguientes granulados enzimáticos para detergentes:¹⁷

1) Proteasas:	Alcalasa 1.5T	1.5 AU/g
	Alcalasa 2.0T	2.0 AU/g
	Alcalasa 2.5T	2.5 AU/g
	Alcalasa 3.0T	3.0 AU/g
	Esperasa 4.0T	4.0 AU/g
	Savinasa 4.0T	4.0 AU/g
2) Amilasas:	Termamil 60T	60 KNU/g
3) Cogranulados:	Alcalasa/BAN	
	1.7/BST	1.7 AU/g y 85 KNU/g.

En donde:

AU/g = unidades alcalasa por gramo.

KNU/g = unidades novo x 10^3 por gramo.

1) Proteasas.

Las proteasas se utilizan en las fórmulas de detergentes para mejorar la eliminación de manchas producidas por proteínas, procedentes de p. ej. sangre, mocosidad, heces y varios productos alimentarios. La enzima cataliza la hidrólisis de sustancias casi insolubles como las mencionadas, que tienden a adherirse a las superficies del material. Los péptidos así producidos son fácilmente solubles o dispersables en el líquido del lavado.²⁴

a) Actividad.

Las figuras 2 y 3 muestran la actividad de las proteasas a va

rias temperaturas y valores de pH para la mayorfa de las aplicaciones de los detergentes.²⁴

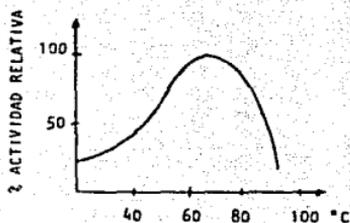


FIGURA 2.
ACTIVIDAD DE PROTEASAS A
DIFERENTES TEMPERATURAS.

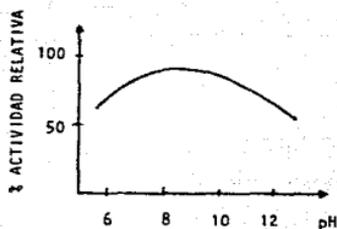


FIGURA 3.
ACTIVIDAD DE PROTEASAS A
DIFERENTES VALORES DE pH.

b) Estabilidad.

Las figuras 4 y 5 muestran la estabilidad de proteasas a varias temperaturas y valores de pH. Los estudios de estabilidad se han realizado en sistemas de amortiguación de bajo poder. Las proteínas y los péptidos en las manchas del lavado tienden a aumentar la estabilidad de la enzima.²⁴

c) Solubilidad.

Las proteasas son fácilmente solubles en las soluciones detergentivas a cualquier concentración, temperatura y valor de pH.

d) Toxicología.

Se producen a base de microorganismos no patógenos y su fabricación es buena, los productos de los microorganismos fermentado--

res no son tóxicos (DL₅₀ 2g/Kg en ratas). Sin embargo, las enzimas por sí mismas desencadenan reacciones inmunológicas en piel y mucosas.

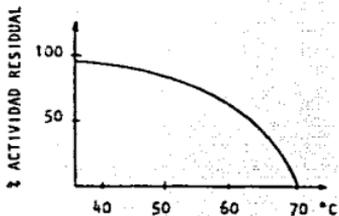


FIGURA 4.
ACTIVIDAD RESIDUAL DE PROTEASAS
DESPUES DE 10 MINUTOS.

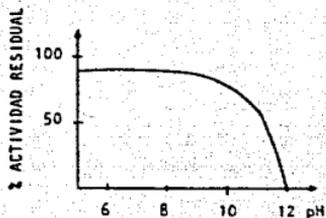


FIGURA 5.
ACTIVIDAD RESIDUAL DE PROTEASAS
DESPUES DE 24 HORAS.

e) Biodegradación.

Son completamente biodegradables ya que las bacterias las utilizan como fuente de energía.

f) Ejemplos de proteasas.

-Alcalasa.- Es una enzima proteolítica, producida mediante la fermentación sumergida de un microorganismo seleccionado que puede clasificarse como una cepa de Bacillus licheniformis. La alcalasa es una endoproteasa de tipo serina con una especificidad de sustrato muy amplia, es decir, hidroliza la mayoría de enlaces peptídicos dentro de una molécula de proteína.¹⁵

-Esperasa.- Es una proteasa producida por la fermentación de un microorganismo seleccionado que puede clasificarse como una espe

de alcalofílica de Bacillus.¹⁶ Proteasa del tipo serina.

-Savinasa.- Es una enzima proteolítica producida mediante la fermentación de un microorganismo que puede clasificarse como una cepa seleccionada de Bacillus alcalofílica.¹⁶ Es también una endo--proteínasa del tipo serina.

2) Amilasas.

Las amilasas se añaden en las fórmulas deterativas para facilitar la eliminación de manchas con base de almidón, p. ej. procedentes de sopas de pasta, chocolate y alimentos infantiles. La enzima cataliza la hidrólisis de almidón, que sin la amilasa tiende a pegarse a las superficies del tejido y a servir de aglutinante para otros componentes complejos de suciedad.²⁴

a) Actividad.

Las figuras 6 y 7 muestran la actividad de las amilasas a varias temperaturas y valores de pH. Bajo condiciones de lavado reales, la enzima muestra un rendimiento satisfactorio a valores de pH entre 8 y 10 y temperaturas de 60 y 70 °C.²⁴

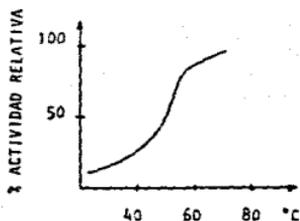


FIGURA 6.
ACTIVIDAD DE AMILASAS A
DIFERENTES TEMPERATURAS

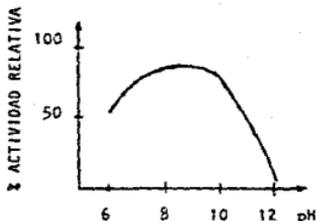


FIGURA 7.
ACTIVIDAD DE AMILASAS A
DIFERENTES VALORES DE pH.

b) Estabilidad.

Las figuras 8 y 9 muestran la estabilidad de esta enzima a varias temperaturas y valores de pH. Los estudios de estabilidad se realizaron en sistemas de amortiguador diluido exentos de calcio - con una concentración enzimática correspondiente al nivel de un l[í]quido de lavado corriente. El almidón y los iones calcio presentes bajo condiciones de lavado corriente, tienden a aumentar la estabilidad enzimática.²⁴

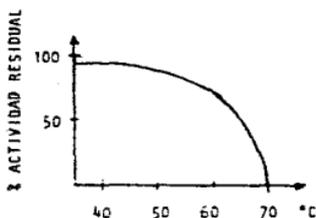


FIGURA 8.

ACTIVIDAD RESIDUAL DE AMILASA PASADOS 30 MIN. EN UN AMORTIGUADOR DE FOSFATOS A DIFERENTES TEMPERATURAS.

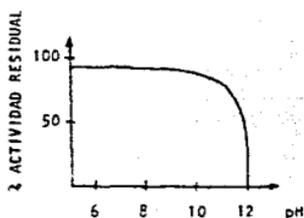


FIGURA 9.

ACTIVIDAD RESIDUAL DE AMILASA PASADAS 24 HRS. EN UN AMORTIGUADOR DE FOSFATOS A DIFERENTES VALORES DE pH.

c) solubilidad.

Es fácilmente soluble en las soluciones detergentes bajo cualquier valor de concentración, temperatura y pH de uso normal.

d) Toxicología.

Se produce a partir de microorganismos no patógenos y los productos de éstos no son tóxicos (DL_{50} 2g/Kg en ratas). Sin embargo las amilasas por sí solas desencadenan reacciones inmunológicas en

piel y mucosas.

e) Biodegradación.

Debido a que las bacterias las utilizan como fuente de energía, este producto es completamente biodegradable.

f) Ejemplo de amilasas.

-Termamil.- Es una enzima amilolítica producida mediante la fermentación sumergida de una cepa seleccionada de Bacillus licheniformis.

Es una endoamilasa que hidroliza los enlaces alfa-1,4-glucosídicos de la amilosa y amilopectina. Por lo tanto, el almidón se descompone rápidamente en dextrinas y oligosacáridos solubles.

3) Cogranulados: Alcalasa/BAN T.

Es un granulado que contiene la enzima proteolítica alcalasa y la enzima amilolítica BAN. Las enzimas se presentan enteramente encapsuladas, recubiertas de una capa inerte. La finalidad exclusiva de Alcalasa/BAN T es como materia prima para formular detergentes en polvo eficaces.²⁴

a) Solubilidad.

Los componentes activos de Alcalasa/BAN T son fácilmente solubles en soluciones deterativas a todas temperaturas y en todas las concentraciones de detergente.

b) Toxicología.

Alcalasa/BAN T se utiliza como un producto no tóxico, debido a que se produce a partir de microorganismos no patógenos y los productos de éstos no causan ningún daño; pero las proteasas y amilasas por sí mismas, desencadenan reacciones inmunológicas en mucosas y piel.

- Niveles de dosificación de microencapsulados.

Los niveles de dosificación recomendados para los microencapsulados enzimáticos son, en por ciento en peso con respecto al detergente:¹⁷

Alcalasa 1.5T	0.5-1.0%
Alcalasa 2.0T	0.4-0.8%
Alcalasa 2.5T	0.3-0.6%
Alcalasa 3.0T	0.2-0.5%
Esperasa 4.0T	0.4-0.8%
Savinasa 4.0T	0.4-0.8%
Termamil 60 T	0.5-1.0%
Alcalasa/BAN 1.7/85 T	0.4-0.8%

A continuación se mencionan los principales factores que deben considerarse al aplicar un producto enzimático a un detergente como son:¹⁹

- 1) Estabilidad y sensibilidad de las enzimas.
- 2) Homogeneidad del producto acabado.
- 3) Naturaleza activa de las enzimas concentradas.
- 4) Higiene fabril y seguridad de trabajo.

Los microencapsulados no deben exponerse a temperaturas altas y humedad durante su elaboración y almacenamiento en la fábrica de detergentes. Los fabricantes recomiendan añadir los granulados al detergente una vez acabado junto con los otros componentes termolábiles, tales como perborato sódico y perfume.

C) ENZIMAS.

Las enzimas son proteínas globulares, complejas y catalizadoras que aceleran la velocidad de una reacción química según factores de 10^{12} a 10^{20} , en relación con las reacciones no catalizadas, a temperaturas de alrededor de 37°C .¹⁴

Las enzimas difieren de otros catalizadores en cuanto a que son macromoléculas sintetizadas por organismos vivos. Químicamente todas las enzimas son proteínas con pesos moleculares que oscilan entre 10^4 y 10^6 una. Su actividad a veces depende de la presencia de sustancias no proteicas (iones metálicos y compuestos orgánicos llamados coenzimas) conocidas como cofactores. Sus características más sobresalientes son su gran eficiencia, especificidad y modulación.

La gran actividad típica de la catálisis enzimática permite que las reacciones se realicen rápidamente en presencia de muy baja concentración de enzimas y en condiciones de reacción moderadas. Para la mayoría de los sistemas, las concentraciones típicas de enzima oscilan entre 10^{-8} y 10^{-10} mol l^{-1} , en tanto que la concentración de sustrato suele ser mayor de 10^{-6} mol l^{-1} .

Es interesante mencionar, que el tamaño de la molécula de enzima es muy grande en comparación con la molécula de sustrato. El sustrato puede representar una porción de alrededor del 1% de la masa total de enzima-sustrato, a pesar de la mayor concentración molar de éste último.

A pesar de sus orígenes biológicos y del papel especial que desempeñan dentro de los sistemas vivos, en muchos aspectos, las enzimas poseen las características similares a las de los catalizadores de origen no viviente. Su función no se encuentra restringida a los confines de las células vivas. Pueden extraerse de fuentes, purificarse, cristalizarse y luego utilizarse con ventajas como catalizadores particularmente selectivos y activos en condiciones de laboratorio o industria.

Las enzimas tienen una secuencia específica de aminoácidos -

(estructura primaria) y además, en su estado activo, tienen una -- conformación específica tridimensional. La función única de la enzima reside en el sitio activo, el cual se establece con base en una configuración espacial particular de la cadena polipeptídica. Los dobles complejos de la cadena forman una hendidura en la que se ubican estratégicamente los puntos de unión del sustrato. Las enzimas distinguen entre diversos sustratos posibles y requieren un sustrato que se ajuste a la forma del sitio activo y que se una a éste en los puntos de enlace específicos.

Las enzimas aumentan la velocidad de las reacciones químicas específicas disminuyendo su energía de activación, además, no alteran el punto de equilibrio de la reacción que promueven, ni se consumen en ellas o experimentan alteraciones permanentes.

La catálisis disminuye la barrera de energía de activación de las reacciones químicas sin alterar la variación de la energía libre global de la reacción o el estado final de equilibrio (FIGURA 10). En el máximo de la barrera de la energía de activación existe un estado de transición. La energía de activación es la cantidad de energía, expresada en calorías, necesaria para llevar todas las moléculas de una mol de una sustancia a una temperatura determinada al estado de transición, en la cima de la barrera de energía.¹⁴

La estructura enzimática no es rígida y, mediante una limitada flexión y distorsión de la hendidura ocupada, auxilia en los procesos de formación y ruptura de enlaces. En esencia, ésta es la forma en que la enzima reduce la energía de activación de la reacción que está catalizando.

Para que la enzima pueda seguir activa, no debe cambiarse la estructura primaria alrededor del sitio activo. Esto significa que deben evitarse los productos químicos que reaccionan con los aminoácidos, tales como formaldehído, agentes de gran potencial de oxidoreducción y los iones de metales pesados.¹⁵

Los cambios importantes en la estructura primaria o la conformación de la enzima pueden provocarse también exponiendo la enzima

a valores extremos de pH o temperaturas elevadas, este proceso es conocido como desnaturalización.

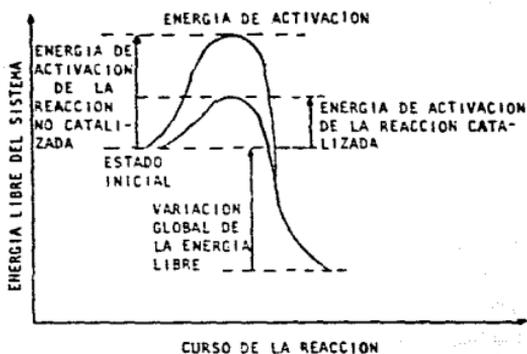


FIGURA 10.
PERFIL ENERGETICO DE UNA REACCION QUIMICA.

D) CINÉTICA ENZIMÁTICA.

La concentración de sustrato ejerce un efecto profundo sobre la velocidad de las reacciones catalizadas por las enzimas, cuando la concentración de ésta se mantiene constante. Si se grafica la velocidad inicial de la reacción en la cual participa la enzima, contra la concentración de sustrato, se obtiene un comportamiento similar al de la Figura 11.

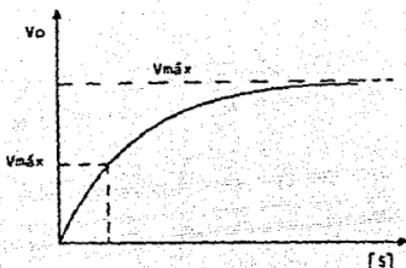


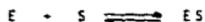
FIGURA 11.

EXPRESIÓN GRÁFICA DE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA DE MICHAELIS-MENTEN.

Si las concentraciones de sustrato son muy bajas la velocidad de la reacción es muy pequeña, pero aumentará al incrementarse la concentración del sustrato. Si se aumentan las concentraciones de sustrato, midiendo cada vez la velocidad inicial de la reacción catalizada, se encontrará que la velocidad aumenta en cantidades cada vez menores. Finalmente se alcanzará un punto más allá del cual sólo se registrarán incrementos muy pequeños, poco significativos de la velocidad de la reacción, cuando aumenta la concentración de sustrato (FIGURA 11). Independientemente de lo que aumente la concentración de sustrato más allá de dicho punto, la velocidad de

la reacción tenderá a aproximarse a una zona plana que no alcanzará nunca. En esta zona, llamada velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) la enzima está saturada con su sustrato y no puede actuar más de prisa.

Esto condujo a Victor Henri, en 1903, a la conclusión de que una enzima se combina con una molécula de sustrato y forma un complejo enzima-sustrato, como etapa necesaria de catálisis. Esta teoría particular fue estudiada hasta constituir una teoría general de la acción de las enzimas que desarrollaron en 1913, Leonor Michaelis y Maud Menten quienes postularon que la enzima E se combina primero reversiblemente con un sustrato S y forman un complejo enzima-sustrato ES, en una reacción reversible relativamente rápida,



el complejo ES se destruye después, mediante una segunda reacción reversible, que es más lenta, y origina el producto P y la enzima E queda libre,



Debido a que la reacción anterior es la etapa limitante de la velocidad, la velocidad global de la reacción catalizada enzimáticamente debe ser proporcional a la concentración del complejo enzima-sustrato. La velocidad será máxima cuando toda la enzima se encuentre en forma del complejo ES y la concentración de la enzima libre E es despreciablemente pequeña. Esta condición existirá cuando la concentración de sustrato sea muy alta, ya que por la ley de acción de masas el equilibrio será desplazado hacia la derecha cuando se incremente la concentración de S,



Si S aumenta hasta niveles muy elevados, toda la enzima libre E se habrá convertido a la forma ES. En la segunda reacción del ciclo catalítico, el complejo ES se rompe rápidamente para dar el producto P y la enzima libre. Pero si la concentración de S es lo suficientemente elevada, la enzima libre E se combinará inmediata-

mente con otra molécula de S. En estas condiciones se alcanza un estado estacionario en el cual la enzima siempre está saturada con su sustrato y la velocidad de la reacción es máxima.

Si se observa la figura 11, que muestra la relación entre la concentración del sustrato y la velocidad de una reacción enzimática, se verá que es difícil deducir con exactitud los valores de la velocidad de la reacción que cada vez se aproximan más a la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y qué concentración de sustrato es la que se necesita para alcanzar la $V_{m\acute{a}x}$. Por esta razón, Michaelis y Menten definieron una constante conocida como K_m , que es útil para establecer la relación precisa entre la concentración del sustrato y la reacción catalizada por la enzima en función de su velocidad. La constante de Michaelis-Menten (K_m), se define como la concentración de sustrato específico al que una enzima determinada produce la mitad de su velocidad máxima.

A valores menores de K_m mayor afinidad enzimática, y a un valor mayor de K_m menor afinidad.

La forma característica de la curva de saturación de una enzima por un sustrato (FIGURA 11), puede expresarse matemáticamente por la ecuación de Michaelis-Menten:¹

$$V_o = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m + S} \dots\dots\dots(1)$$

en donde,

V_o = velocidad inicial si la concentración de sustrato es S

$V_{m\acute{a}x}$ = velocidad máxima.

K_m = constante de Michaelis-Menten de la enzima para un sustrato en particular.

Esta ecuación fue deducida por Michaelis y Menten partiendo de la hipótesis básica de que la etapa limitante de la velocidad en las reacciones enzimáticas es la ruptura del complejo enzima-sustrato para formar el producto y la enzima libre.

Cada enzima posee una K_m característica para cada sustrato en condiciones establecidas de pH y temperatura. Puede obtenerse un valor aproximado de K_m por un procedimiento gráfico sencillo como se muestra en la figura 11, sin embargo, resulta difícil determinar la velocidad máxima con exactitud, ya que es un valor aproximado que nunca se alcanza en la realidad. Puede obtenerse un valor más exacto de K_m expresando los mismos datos de diferente manera, esto es posible tomando los recíprocos de ambos lados de la ecuación 1, con lo que se transforma en:

$$1/V_o = (K_m/V_{m\acute{a}x}) (1/S) + 1/V_{m\acute{a}x} \dots\dots\dots(2)$$

Esta ecuación es una transformación de la representación de Michaelis-Menten (ecuación 1) llamada ecuación de Lineweaver-Burk o representación doble recíproca. Las enzimas que cumplen con la ecuación 1, obedecen también la representación doble recíproca y se construye graficando $1/V_o$ contra $1/S$ (FIGURA 12). Esta línea tendrá una pendiente $K_m/V_{m\acute{a}x}$, una ordenada al origen $1/V_{m\acute{a}x}$ y una intersección de $-1/K_m$ sobre el eje $1/S$.

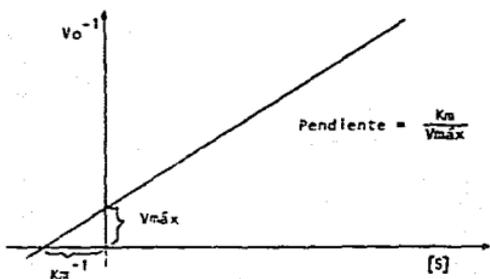


FIGURA 12.
TRANSFORMACION DE LA ECUACION DE MICHAELIS-MENTEN A LA ECUACION DE LINEWEAVER-BURK.

La representación de Lineweaver-Burk es una forma muy útil para determinar con mayor exactitud el valor de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m , además de que tiene la ventaja de que estos valores son estadísticamente significativos a partir de seis u ocho puntos experimentales.⁹

Para medir la cantidad de enzima presente en una muestra, se mide la velocidad de la reacción catalizada por ella. En circunstancias apropiadas (pH y temperatura) la velocidad medida es proporcional a la cantidad de enzima presente. Cuando es posible, esta velocidad se compara con la velocidad catalizada por una cantidad conocida de la enzima altamente purificada. Puede calcularse la cantidad de enzima en un extracto siempre que ambas sean analizadas en condiciones idénticas y la concentración de la enzima sea el factor limitante. Sin embargo, no es fácil determinar el número de moléculas o la masa de la enzima presente, por lo tanto, los resultados se expresan en unidades enzimáticas.

Las cantidades relativas de la enzima se pueden entonces comparar en diferentes muestras. Las unidades enzimáticas son expresadas en micromoles (10^{-6} mol), nanomoles (10^{-9} mol) o picomoles (10^{-12} mol) de sustrato reaccionante o de producto formado por minuto. Las Unidades Enzimáticas Internacionales correspondientes son U, nU y pU.¹⁰

V

DESARROLLO EXPERIMENTAL

A) MATERIALES.

1) Material biológico.

- Microencapsulado I: contiene un núcleo de enzimas las cuales tienen actividad de proteasas (Industrias Novo).
- Microencapsulado II: es un granulado combinado, contiene enzimas con actividad de proteasas y amilasas (Industrias Novo).
- Tripsina patrón (SIGMA).
- Alfa-amilasa patrón (SIGMA).
- Caseína patrón (SIGMA).
- Amilosa patrón (SIGMA).

2) Material químico.

- Fosfato diácido de potasio, KH_2PO_4 R.A.
- Fosfato ácido de potasio, K_2HPO_4 R.A.
- Ácido tricloroacético al 5% p/v.
- Ácido clorhídrico 0.001 y 0.002 N.
- Yodo R.A.
- Yoduro de potasio R.A.
- Cloruro de sodio 0.1 M.
- Hidróxido de sodio 0.1 N.
- Etanol R.A.

3) Material de vidrio de laboratorio.

B) EQUIPO.

- Espectrofotómetro Coleman-Junior II modelo 6/20.
- Espectrofotómetro ZEISS modelo PM20.
- Potenciómetro Corning modelo 12.
- Centrifuga DANDON/IEC DIVISION.
- Agitador y parrilla eléctrico Corning modelo PC-351.

C) METODOS.

Las actividades enzimáticas de alfa-amilasa y proteasa encapsuladas, se comparan con actividades de enzimas patrón definidas, estas enzimas son alfa-amilasa y tripsina como proteasa.

DIAGRAMA DE FLUJO

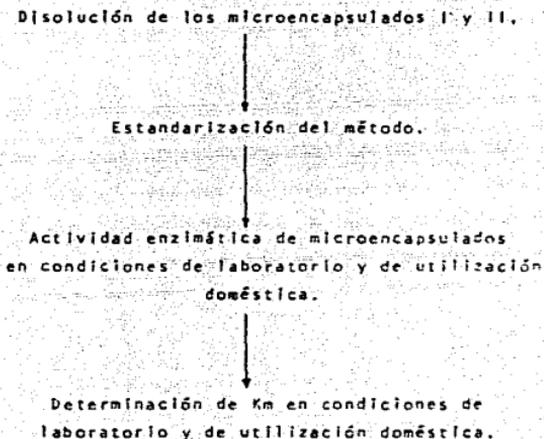


FIGURA 13.

ESTE DIAGRAMA DE FLUJO REPRESENTA EL ORDEN EN QUE SE REALIZARON LAS DETERMINACIONES PARA COMPROBAR LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LOS MICROENCAPSULADOS.

1) Disolución de los microencapsulados.

a) Condiciones de laboratorio.

- Se disuelven 100 mg de microencapsulado I en 100 ml de HCl 0.001 N (microencapsulado 1mg/ml de HCl 0.001 N). - Se realiza el mismo procedimiento para el microencapsulado II.

- Disolver 100 mg de microencapsulado I en 100 ml de cloruro de sodio 0.1 M (microencapsulado 1 mg/ml de NaCl 0.1 M). El mismo procedimiento se realiza para el microencapsulado II.

b) Disolución en agua corriente.

- Realizar la solubilización de 10 mg de los microencapsulados I y II (por separado) en 100 ml de agua corriente de la llave (microencapsulado 0.1 mg/ml de agua común).

c) Condiciones de utilización doméstica.

- Disolver 10 mg de los microencapsulados I y II por separado en 100 ml de agua corriente de la llave y agregar un detergente no biológico en tres diferentes concentraciones con respecto al microencapsulado:

- 99% p/v.

- 95% p/v.

- 90% p/v.

2) Condiciones de trabajo.

a) Condiciones de laboratorio.

Condiciones en las cuales se controla el pH con una solución amortiguadora y una temperatura de incubación con un baño María, - además el agua utilizada fue bidestilada.

b) Condiciones en agua común.

En esta parte del proyecto, no se controla el pH ni la temperatura, es decir, el pH es el que tiene el agua corriente de la llave y la temperatura es la ambiente.

c) Condiciones de utilización doméstica.

En estas condiciones tampoco se controla el pH y la temperatura.

ra, las determinaciones de la actividad enzimática para los dos tipos de microencapsulados se realizan en agua corriente de la llave y las diferentes concentraciones de detergente ya mencionadas.

- 3) Estandarización del método para medir la actividad de PROTEASA.
Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

Principio.

La tripsina hidroliza caseína en los sitios en los cuales se encuentran tirosina y triptofano liberando éstos, los cuales son solubles en ácido tricloroacético y tienen una absorbancia a 280nm. El método se basa en la medida de la absorbancia, ésta nos da directamente la actividad de la enzima.

Reactivos.

- I Amortiguador de fosfatos 0.1M en agua bidestilada, pH 7.6.
- II Solución de caseína, 10 mg/ml en amortiguador de fosfatos 0.1 M.
- III Solución de tripsina, 0.1 mg/ml en HCl 0.002 N.
- IV Acido tricloroacético, 5% p/v en agua bidestilada.

Procedimiento.

Precalentar la solución de caseína en un baño de agua a 35 °C aproximadamente 5 minutos.

Preparar una serie de 8 tubos de ensaye en el mismo baño:

Blancos

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución II (ml)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Solución IV (ml)	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Solución III (ml)	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14
Solución I (ml)	0.99	0.98	0.96	0.94	0.92	0.90	0.88	0.86

Dejar reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Curva Patrón

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución III (ml)	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14
Solución I (ml)	0.99	0.98	0.96	0.94	0.92	0.90	0.88	0.86
Solución II (ml)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Mezclar y dejar incubar por 20 minutos. Agregar 3 ml de solución IV y dejar reposar a temperatura ambiente 30 minutos.

Centrifugar los blancos y las muestras estándar por 20 minutos a 3000 X g. Leer la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm. Se resta la absorbancia del blanco a la absorbancia de la muestra estándar correspondiente.

Los resultados se presentan en la tabla I y gráfica I.

4) Actividad enzimática de proteasa en MICROENCAPSULADOS.

Llevar a cabo el procedimiento (3) sólo que la tripsina se sustituye por soluciones de microencapsulados (I y II) con las siguientes concentraciones:

Microencapsulado I, 1 mg/ml en HCl 0.001 N.

Microencapsulado II, 1 mg/ml en HCl 0.001 N.

Realizar la siguiente serie tanto para las muestras problema como para los blancos:

Tubos	1	2	3	4	5
Microencapsulado I (ml)	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
Solución I (ml)	0.95	0.90	0.80	0.70	0.60

Tubos	1	2	3	4	5
Microencapsulado II (ml)	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
Solución I (ml)	0.95	0.90	0.80	0.70	0.60

Los resultados obtenidos se reportan en la tabla II.

5) Comportamiento de los MICROENCAPSULADOS con respecto a tripsina.

De acuerdo a los resultados de la tabla II y utilizando la gráfica I, se tiene que a una concentración de microencapsulados (I y II) de 0.1 mg/ml corresponde una concentración de proteasa de 0.002 mg/ml, procediendo entonces a preparar los siguientes tubos problema de acuerdo al método (3):

Tubos	1	2	3	4	5	6
Microencapsulados I (ml)	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
Solución I (ml)	0.95	0.90	0.80	0.70	0.60	0.50

Tubos	1	2	3	4	5	6
Microencapsulados II (ml)	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
Solución I (ml)	0.95	0.90	0.80	0.70	0.60	0.50

Los resultados están en la tabla III y gráfica II.

6) Actividad enzimática de los MICROENCAPSULADOS en agua común a 1, 2, 4, 8 y 24 horas.

De la tabla II y la gráfica I se tiene que la concentración de microencapsulados (I y II) a trabajar es de 0.1 mg/ml.

Disolver 10 mg de microencapsulados (I y II) en 100 ml de agua corriente de la llave (0.1 mg/ml), y se consideran los siguientes tiempos en que permanecen disueltos en agua los microencapsulados:

1, 2, 4, 8 y 24 horas.

Llevar a cabo el procedimiento (3), sustituyendo la solución amortiguadora por agua común y la temperatura de trabajo es la ambiente.

Se calcula la actividad enzimática con la siguiente relación:

$$TU^{Cas} / \text{mg de proteasa} = \frac{A}{20 \times P} \dots\dots\dots (3)$$

en donde:

- TU^{Cas} = cantidad de proteasa que liberan los productos de la hidrólisis de caseína en incrementos de un minuto.
- A = absorbancia de la muestras - absorbancia de los blancos.
- P = miligramos de proteasa por mililitro.
- 20 = minutos de incubación.

7) Actividad enzimática de los MICROENCAPSULADOS en condiciones de utilización doméstica a 1, 2, 4, 8 y 24 horas.

Realizar el procedimiento (6), sólo que los microencapsulados se preparan en 1%, 5% y 10% en peso con respecto a un detergente - no biológico.

Los resultados se muestran en las tablas V.

B) Determinación de la constante de Michaelis-Menten (Km) en condiciones de laboratorio y de utilización doméstica.

a) Condiciones de laboratorio.

Realizar el procedimiento (3) ahora manteniendo constante la concentración de microencapsulados (I y II) a un valor de 1 mg/ml y la concentración de caseína se varía de la siguiente manera:

Caseína en % p/v

- a) 0.001
- b) 0.010
- c) 0.100
- d) 1.000
- e) 5.000
- f) 10.000

En las tablas VI y VII y las gráficas III y IV se reportan los resultados de la cinética enzimática en estas condiciones.

b) Condiciones de utilización doméstica.

Para determinar la cinética enzimática de los microencapsulados (I y II) en condiciones de utilización, realizar el procedimiento (7) para una concentración de microencapsulados en un 10% en peso con respecto al detergente, y las concentraciones de caseína se preparan de acuerdo al método (8a).

En las tablas VIII y IX y las gráficas V y VI se reportan los resultados.

9) Estandarización del método para medir la actividad de ALFA-AMILASA.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

Principio.

La alfa-amilasa hidroliza los enlaces alfa-1,4- glucosídicos de la amilosa, descomponiéndose en dextrinas y oligosacáridos. La solución yodo-yoduro reacciona con la amilosa formando un complejo azul en la solución, el cual se detecta a 620 nm; el método se basa en la medida de la absorbancia de la desaparición del color azul ya que la solución yodo-yoduro no reacciona con dextrinas y oligosacáridos, estas medidas de absorbancia dan directamente la actividad de la enzima.

Reactivos.

I Amortiguador de fosfatos, 0.1 M en agua bidestilada, pH 7.0

II Solución de amilosa, 0.1% p/v en NaOH-Etanol 9:1.

III Solución de alfa-amilasa, 0.1 mg/ml en NaCl 0.1 M.

IV Solución yodo-yoduro de potasio, 0.01 M en agua bidestilada.

V Solución cloruro de sodio 0.1 M.

VI Solución de ácido clorhídrico 0.01 N.

Procedimiento.

Preparar las siguientes muestras estándar de alfa-amilasa en cloruro de sodio 0.1 M:

Solución de alfa-amilasa (mg/ml):

- 1) 0.001
- 2) 0.005
- 3) 0.020
- 4) 0.040
- 5) 0.060
- 6) 0.080
- 7) 0.090

Curva Patrón.

Preparar una serie de 8 matraces volumétricos de 100 ml según el siguiente esquema:

Matraz	1	2	3	4	5	6	7	Blanco
Solución I (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5
Solución II (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2
Solución VI (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2

Colocar los matraces volumétricos marcados del 1 al 7 en un baño María a 37 °C por 3 minutos. Adicionar a cada matraz 1 ml de las muestras de alfa-amilasa preparadas anteriormente según el número de matraz que le corresponda.

Dejar los matraces en el baño 15 minutos.

Diluir los contenidos de los 8 matraces a aproximadamente 80 mililitros con agua bidestilada y adicionar rápidamente 4 ml de la solución IV. Aforar a 100 ml con agua bidestilada y medir la absorbancia de las 8 soluciones a 620 nm. Calibrar con agua bidestilada.

Los resultados se muestran en la tabla X y la gráfica VII.

La actividad enzimática de alfa-amilasa se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática} = 26.2068 \times E_T = \text{Unidades Street-Clouse en 100 ml de muestra} \quad (4)$$

en donde:

E_T = absorbancia de la muestra - absorbancia del blanco.

86.2068 = factor de dilución en función del blanco.

10) Actividad enzimática de alfa-amilasa en MICROENCAPSULADOS.

Realizar el procedimiento (9), sólo que la alfa-amilasa pura se sustituye por soluciones de microencapsulados (I y II).

Preparar las siguientes muestras de microencapsulados en cloruro de sodio 0.1 M:

Microencapsulado I (ng/ml)

- 1) 0.01
- 2) 0.05
- 3) 0.20
- 4) 0.40
- 5) 0.60
- 6) 0.80

De la misma manera preparar muestras de los microencapsulados identificados como II.

En las tablas XI y XII se muestran los resultados obtenidos.

11) Actividad enzimática de los MICROENCAPSULADOS en agua común a 1, 2, 4, 8 y 24 horas.

De los resultados obtenidos de las tablas XI y XII se tiene que solamente los microencapsulados I presentan actividad enzimática de alfa-amilasa, además de que la concentración óptima de trabajo es de 0.4 mg/ml.

Disolver 40 ng de microencapsulado I en 100 ml de agua común (0.4 mg/ml) y considerar los siguientes tiempos de permanencia de los microencapsulados disueltos en agua:

1, 2, 4, 8 y 24 horas.

Llevar a cabo el método (9) para comprobar la actividad enzimática a diferentes horas y a temperatura ambiente:

Matraz		1	Blanco
Solución II	(ml)	2	2
Agua común	(ml)	7	7
Microencapsulado I	(ml)	1	1

Los resultados se muestran en la tabla XIII.

12) Actividad enzimática de los MICROENCAPSULADOS I en condiciones de utilización doméstica a 1, 2, 4, 8 y 24 horas.

Realizar el procedimiento (11) preparando los microencapsulados I en 1, 5 y 10% en peso con respecto a un detergente no biológico.

En la tabla XIV se muestran los resultados obtenidos.

13) Determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_m) en condiciones de laboratorio y de utilización doméstica.

a) Condiciones de laboratorio.

Efectuar el procedimiento (5), la concentración de microencapsulado I (0.4 mg/ml) se mantiene constante y se varía la concentración de amilosa de la siguiente manera:

Amilosa en % p/v

- a) 0.0001
- b) 0.0010
- c) 0.0100
- d) 0.1000
- e) 1.0000
- f) 5.0000

Los resultados se presentan en las tablas XV y XVI y las gráficas VIII y IX.

b) Condiciones de utilización doméstica.

Realizar el procedimiento (12) los microencapsulados 1 se preparan en un 10 % en peso con respecto al detergente y las concentraciones de amilosa se preparan de acuerdo al método (13a).

Los resultados se muestran en las tablas XVII y XVIII y las gráficas X y XI.

14) Determinación del pH del agua corriente y de las soluciones de detergente.

Mediante un potenciómetro realizar las siguientes mediciones de pH, con el fin de ver cómo varía esta propiedad en las diferentes condiciones impuestas:

- a) Agua común.
- b) Agua común con detergente.

Preparar soluciones de detergente de acuerdo al procedimiento (12) de la siguiente manera:

- 99%
- 95%
- 90%

Estos valores de detergente son con respecto a la cantidad de microencapsulado 1, es decir, 1, 5 y 10% en peso de éste respectivamente.

Los resultados de las determinaciones de pH se muestran en la tabla XIX.

VI
RESULTADOS Y DISCUSION

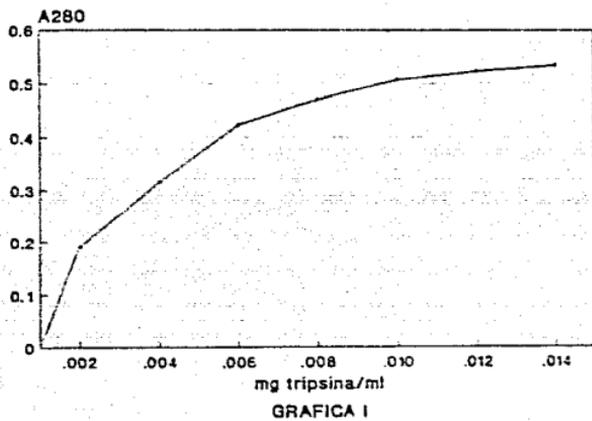
1) Estandarización del método para medir la actividad enzimática -
de PROTEASA.

Tripsina (mg/ml)	A ₂₈₀
0.001	0.121
0.002	0.191
0.004	0.315
0.006	0.424
0.008	0.471
0.010	0.507
0.012	0.522
0.014	0.534

TABLA I. Hidrólisis de caseína por la acción
de tripsina (20 minutos de incuba-
ción a 35°C y pH 7.6).

A₂₈₀ = Absorbancia a 280 nm.

HIDROLISIS DE CASEINA POR TRIPSINA



Con los datos reportados en la tabla I se construyó la gráfica I, en ésta se puede ver cómo a medida que aumentamos las concentraciones de tripsina la actividad enzimática aumenta, hasta que en un momento dado aunque se aumente la concentración de la enzima la actividad no tiene variaciones considerables, debido a que la enzima pierde su eficiencia enzimática.

2) Actividad enzimática de proteasa en MICROENCAPSULADOS.

Microencapsulados I y II (mg/ml)	A_{I-280}	A_{II-280}
0.05	0.055	0.092
0.10	0.192	0.193
0.20	0.382	0.353
0.30	0.563	0.563
0.40	0.735	0.733

TABLA II. Medidas de absorbancia en la hidrólisis de caseína por los microencapsulados I y II (20 minutos de incubación a 35°C y pH 7.6).

A_{I-280} = Absorbancia a 280 nm de microencapsulado I.

A_{II-280} = Absorbancia a 280 nm de microencapsulado II.

De los datos de la tabla II, se comprobó que los microencapsulados I y II presentan actividad enzimática de proteasas, así como ésta es semejante para los dos.

Una vez que se ha comprobado que los microencapsulados I y II tienen actividad enzimática, se calculó en que cantidad está la enzima (proteasa) en ellos; esto se realizó de acuerdo a la absorbancia que presentaban las muestras y ésta interpolándola a la parte lineal de la gráfica 1.

De acuerdo a la ecuación (3) y con una absorbancia de 0.192 se tiene:

$$TU^{Cas} / \text{mg de proteasa} = \frac{A}{20 \times P} \dots\dots(3)$$

Los microencapsulados I y II (0.1 mg/ml) contienen una concentración de proteasa de 0.002 mg/ml, es decir, la proteasa se encuentra en un 2% con respecto al microencapsulado.

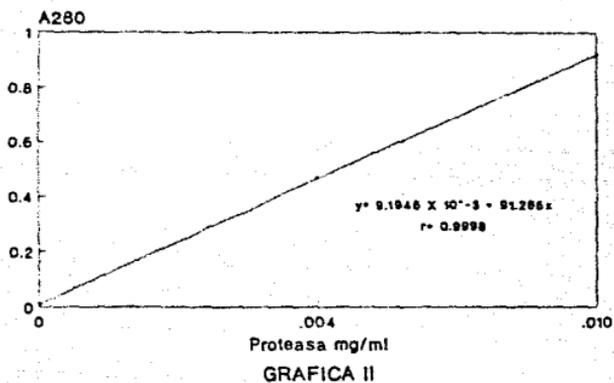
$$\text{Actividad enzimática} = 4.8 TU^{Cas} / \text{mg de proteasa.}$$

3) Comportamiento de los MICROENCAPSULADOS con respecto a tripsina.

Microencapsulados I y II (mg/ml)	Proteasa (mg/ml)	A ₂₈₀
0.05	0.001	0.093
0.10	0.002	0.192
0.20	0.004	0.383
0.30	0.006	0.563
0.40	0.008	0.734
0.50	0.010	0.920

TABLA III. Hidrólisis de caseína por proteasa microencapsulada (20 minutos de incubación a 35 °C y pH 7.6).

HIDROLISIS DE CASEINA POR LOS
MICROENCAPSULADOS I Y II, LOS
CUALES CONTIENEN PROTEASA



Con los resultados obtenidos en la tabla III y con la gráfica II se puede ver que la proteasa en los microencapsulados tiene un comportamiento diferente a la tripsina (gráfica I), por lo tanto, la proteasa microencapsulada no es tripsina, y además es más activa, ya que, a la concentración de 0.1 mg/ml se tiene mayor liberación de tirosina y triptofano lo cual se observa por el aumento de la absorbancia.

4) Actividad enzimática de los MICROENCAPSULADOS en agua común a 1, 2, 4, 8 y 24 horas.

Tiempo (horas)	Actividad enzimática (TU ^{Cas} /mg de proteasa)
1	1.625
2	1.587
4	1.625
8	1.600
24	1.575

TABLA IV. Actividad enzimática de microencapsulados I y II (0.1 mg/ml) a diferentes tiempos.

A diferentes tiempos en los cuales los microencapsulados han estado solubilizados en agua común y a temperatura ambiente, la actividad enzimática no tiene variaciones considerables, aunque con respecto a la actividad que presentan en condiciones de laboratorio (4.8 TU^{Cas}/mg de proteasa), ésta ha disminuído en un 66.60%.

La actividad enzimática de los microencapsulados no se ve afectada por el tiempo, sino por otro tipo de factores.

- 5) Actividad enzimática de MICROENCAPSULADOS en condiciones de utilización doméstica a 1, 2, 4, 8 y 24 horas.

Tiempo (horas)	Actividad enzimática (TU ^{Cas} /mg de proteasa)
1	1.625
2	1.575
4	1.575
8	1.600
24	1.550

TABLA V(a). 1% de microencapsulados y 99% de detergente.

Tiempo (horas)	Actividad enzimática (TU ^{Cas} /mg de proteasa)
1	1.600
2	1.625
4	1.600
8	1.600
24	1.550

TABLA V(b). 5% de microencapsulados y 95% de detergente.

Tiempo (horas)	Actividad enzimática (TU ^{Cas} /mg de proteasa)
1	1.650
2	1.575
4	1.600
8	1.575
24	1.550

TABLA V(c). 10% de microencapsulados y 90% de detergente.

TABLAS V. Actividad enzimática de microencapsulados I y II (0.1 mg/ml) en condiciones de utilización.

En condiciones de utilización doméstica con diferentes concentraciones de detergente y tiempos, la actividad enzimática no se ve afectada, y ésta disminuye con respecto a la actividad que presentan los microencapsulados en condiciones de laboratorio - (4.8 TU^{cas}/mg de proteasa) entre un 66-67%.

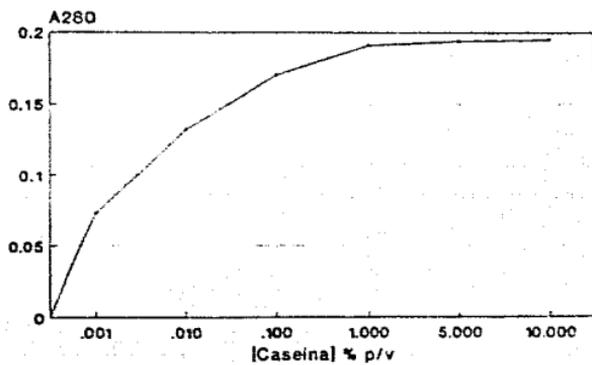
Por lo tanto, la actividad enzimática de los microencapsulados no se ve afectada por el detergente a diferentes concentraciones, ni por el tiempo.

6) Determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_m) en condiciones de laboratorio.

Caseína(¿ p/v)	A_{280}
0.001	0.073
0.010	0.132
0.100	0.170
1.000	0.191
5.000	0.194
10.000	0.195

TABLA VI. Cinética enzimática de microencapsulados I y II (0.1 mg/ml) los cuales contienen proteasa (20 - minutos de incubación a 35 °C y pH 7.6).

CINETICA ENZIMATICA DE LOS MICROENCAPSULADOS I Y II



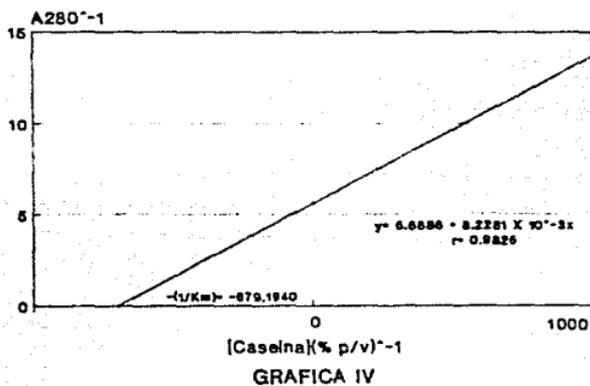
GRAFICA III

7) Representación de Lineweaver-Burk para calcular Km.

Caseína (% p/v) ⁻¹	A ₂₈₀ ⁻¹
1000	13.6986
100	7.5757
10	5.8823
1.0	5.2356
0.2	5.1546
0.1	5.1282

TABLA VII. Recíprocos de los valores de la tabla VII.

REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK
PARA CALCULAR Km
Km = 14723 X 10⁻³



En la tabla VI y la gráfica III se muestra cómo la proteasa microencapsulada sigue una cinética enzimática de acuerdo a la teoría de Michaelis y Menten, la cual nos dice: "a medida que se aumenta la concentración de sustrato la velocidad de la reacción aumenta proporcionalmente a este cambio, hasta que en un momento dado en que se sigue aumentando la concentración de sustrato, las variaciones de la velocidad ya no son considerables debido a que la enzima está saturada de sustrato y la velocidad se mantiene constante (velocidad máxima = $V_{m\acute{a}x}$)".¹⁴

Por lo tanto, como esta enzima tiene este comportamiento se puede calcular K_m (constante de Michaelis-Menten) de acuerdo al tratamiento de Lineweaver-Burk (Tabla VII, gráfica IV).

En condiciones de laboratorio (20 minutos de incubación a 35 °C y pH 7.6) el valor de K_m es:

$$K_m = 1.4723 \times 10^{-3}$$

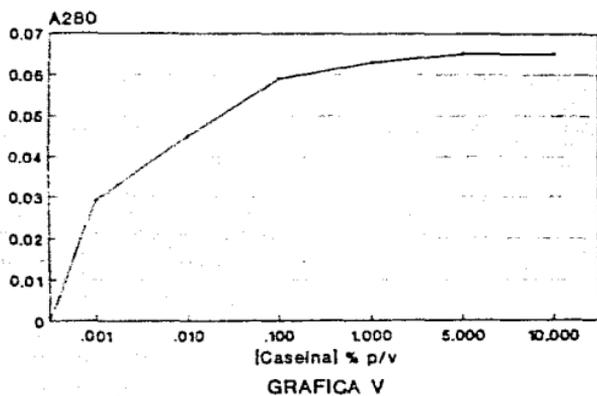
y se refiere a la cantidad de sustrato necesaria para saturar las moléculas de enzima en un 50%, K_m es específica para cada enzima con su sustrato e indica afinidad. Por lo tanto, la proteasa es inespecífica debido a que tiene alta actividad con una proteína que no es su sustrato y esto es importante ya que la enzima encapsulada puede hidrolizar cualquier tipo de proteína.

8) Determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_m) en condiciones de utilización.

Caseína (% p/v)	A_{280}
0.001	0.029
0.010	0.045
0.100	0.059
1.000	0.063
5.000	0.065
10.000	0.065

TABLA VIII. Cinética enzimática de los microencapsulados I y II (0.1 mg/ml) en condiciones de utilización.

CINETICA ENZIMATICA DE LOS MICROENCAPSULADOS I Y II

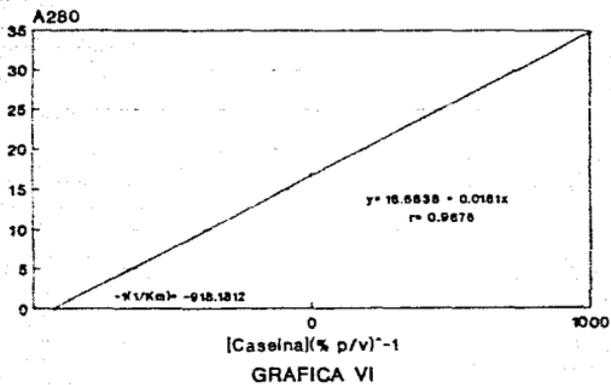


5) Representación de Lineweaver-Burk para calcular K_m .

Casefna ($\frac{1}{p/v}$) ⁻¹	A ₂₈₀ ⁻¹
1000	34.4827
100	22.2222
10	16.9491
1.0	15.9730
0.2	15.3486
0.1	15.3446

TABLA IX. Recíprocos de los resultados de la tabla VIII.

REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK
PARA CALCULAR Km
 $K_m = -1.0891 \times 10^{-3}$



En condiciones de utilización doméstica la proteasa microencapsulada también presenta un comportamiento de acuerdo a la teoría de Michaelis-Menten (Tabla VIII, gráfica V), por lo tanto, la constante de Michaelis-Menten se calculó de acuerdo al tratamiento de Lineweaver-Burk (Tabla IX, gráfica VI):

$$K_m = 1.0891 \times 10^{-3}$$

y comparada con la K_m en condiciones de laboratorio, se observa que hay una mínima variación, la cual significa que tiene el mismo comportamiento con o sin detergente.

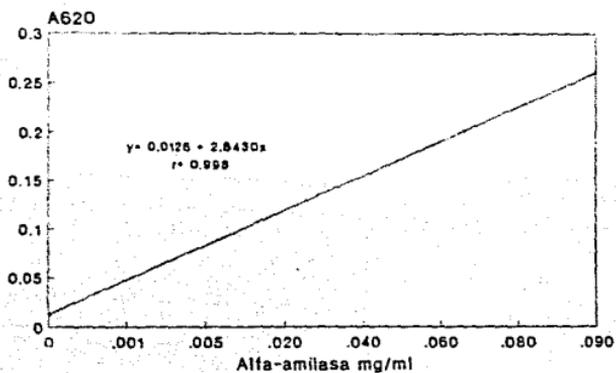
10) Estandarización del método para medir la actividad de ALFA-AMILASA.

Alfa-amilasa (mg/ml)	A ₆₂₀
0.001	0.010
0.005	0.030
0.020	0.070
0.040	0.130
0.060	0.180
0.080	0.250
0.090	0.260

TABLA X. Curva patrón. Hidrólisis de amilosa por la acción de alfa-amilasa (15 minutos de incubación a 37 °C y pH 7.0).

A₆₂₀ = Absorbancia a 620 nm.

CURVA PATRON
HIDROLISIS DE AMILOSA POR ALFA-AMILASA



GRAFICA VII

Los datos de la tabla X representan la actividad de alfa-amilasa pura en función de la absorbancia a 620 nm, teniendo como sustrato amilosa (Gráfica VII), las variaciones de la actividad son proporcionales a las concentraciones de enzima, es decir, a mayor concentración de alfa-amilasa mayor actividad enzimática.

11) Actividad enzimática de alfa-amilasa en MICROENCAPSULADOS I.

Microencapsulados I (mg/ml)	A ₆₂₀
0.01	0.01
0.05	0.05
0.20	0.10
0.40	0.12
0.60	0.18
0.80	0.18

TABLA XI. Medidas de absorbancia en la hidrólisis de amilosa por microencapsulados I (15 minutos de incubación a 37 °C y pH 7.0).

12) Actividad enzimática de alfa-amilasa en MICROENCAPSULADOS II.

Microencapsulados II (mg/ml)	A ₆₂₀
0.01	0.00
0.05	0.01
0.20	0.01
0.40	0.01
0.60	0.02
0.80	0.02

TABLA XII. Medidas de absorbancia en la hidrólisis de amilosa por microencapsulados II (15 minutos de incubación a 37 °C y pH 7.0).

Con los resultados de las tablas XI y XII se obtiene que solamente los microencapsulados I presentan actividad enzimática de alfa-amilasa.

De la gráfica VII y para una concentración de microencapsulados de 0.4 mg/ml (Tabla XI), se tiene que éstos contienen una concentración de alfa-amilasa de 0.0377 mg/ml, es decir, un 9.42% de la enzima en los microencapsulados I, siendo esta concentración con la que se trabajó en las pruebas posteriores.

De acuerdo a la ecuación (4), se calculó la actividad enzimática para alfa-amilasa a una concentración de 0.0377 mg/ml contenida en los microencapsulados I en condiciones de laboratorio ya especificadas:

$$\text{Actividad enzimática} = 86.2068 \times E_T = \text{Unidades Street-Close en 100 ml de muestra} \dots (4)$$

$$\text{Actividad enzimática} = 10.3448 \text{ Unidades Street-Close/100 ml de muestra.}$$

13) Actividad enzimática de los MICROENCAPSULADOS I en agua común a 1, 2, 4, 8 y 24 horas.

Tiempo (horas)	Actividad enzimática (Unidades Street-Close/100 ml de muestra)
1	3.4482
2	3.4482
4	3.4482
8	3.4482
24	3.4482

TABLA XIII. Actividad enzimática de microencapsulados I (0.4 mg/ml) a diferentes tiempos.

Analizando los resultados de la tabla XIII se tiene que, a diferentes tiempos de solubilización de los microencapsulados en agua corriente de la llave no existe variación de la actividad enzimática, pero ésta disminuye en un 66.66% con respecto a las condiciones de laboratorio (10.3448 Unidades Street-Close/100 ml).

La actividad enzimática de los microencapsulados I no se ve afectada por el tiempo.

14) Actividad enzimática de MICROENCAPSULADOS I en condiciones de utilización doméstica a 1, 2, 4, 8 y 24 horas.

Tiempo (horas)	Actividad enzimática (++)
1	3.4482
2	3.4482
4	3.4482
8	3.4482
24	3.4482

TABLA XIV(a). 1% de microencapsulados y 99% de detergente.

Tiempo (horas)	Actividad enzimática (++)
1	3.4482
2	3.4482
4	3.4482
8	3.4482
24	3.4482

TABLA XIV(b). 5% de microencapsulados y 95% de detergente.

Tiempo (horas)	Actividad enzimática (++)
1	3.4482
2	3.4482
4	3.4482
8	3.4482
24	3.4482

TABLA XIV(c). 10% de microencapsulados y 90% de detergente.

TABLAS XIV. Actividad enzimática de microencapsulados I (0.4 mg/ml) en condiciones de utilización.

++ = Unidades Street-Close/100 ml. de muestra.

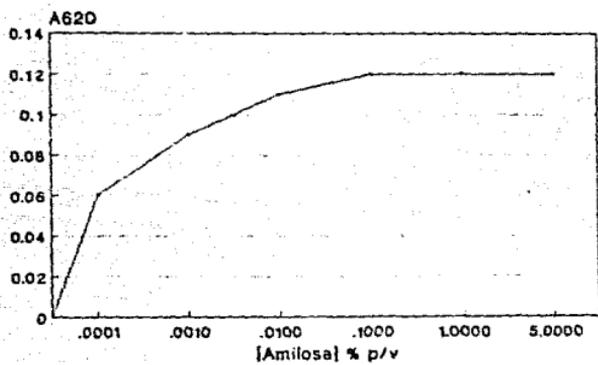
En condiciones de utilización doméstica con diferentes tiempos y concentraciones de detergente (Tabla XIV), la actividad enzimática no se ve afectada por el detergente, ya que, los microencapsulados siguen presentando la misma actividad a diferentes concentraciones de detergente y tiempos, además de que dicha actividad es exactamente la misma que sin el detergente.

15) Determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_m) en condiciones de laboratorio.

Amilosa (g p/v)	A_{620}
0.0001	0.60
0.0010	0.09
0.0100	0.11
0.1000	0.12
1.0000	0.12
5.0000	0.12

TABLA XV. Cinética enzimática de microencapsulados 1 los cuales contienen alfa-amilasa (15 minutos de incubación a 37 °C y pH 7.0).

CINETICA ENZIMATICA DE MICROENCAPSULADOS I



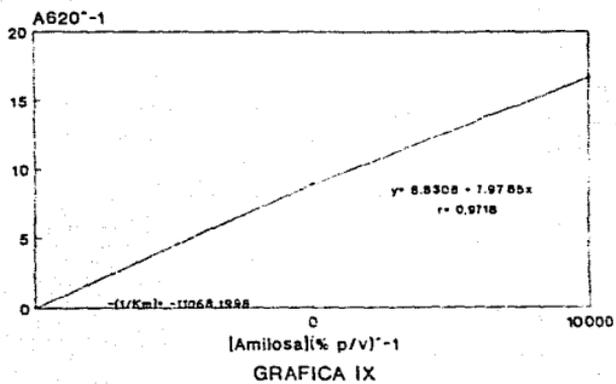
GRAFICA VIII

16) Representación de Lineweaver-Burk para calcular Km.

Amilosa (μ p/v) ⁻¹	A ₆₂₀ ⁻¹
10000	16.66
1000	11.11
100	9.09
10	8.33
1.0	8.33
0.2	8.33

TABLA XVI. Recíprocos de los valores de la tabla XV.

REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK
PARA CALCULAR Km
Km = 9.0349 X 10⁻⁵



La alfa-amilasa microencapsulada sigue la teoría de Michaelis-Menten (Tabla XV, Gráfica VIII), por lo tanto, mediante el método de Lineweaver-Burk se puede calcular K_m (constante de Michaelis-Menten) para esta enzima mediante la tabla XVI y la gráfica IX la cual en condiciones de laboratorio es:

$$K_m = 9.0349 \times 10^{-5}$$

que es la cantidad necesaria de sustrato (amilosa) para saturar la mitad de las moléculas de alfa-amilasa, siendo esta constante específica para cada enzima con su sustrato e indica afinidad. Por lo tanto, la alfa-amilasa encapsulada tiene una gran afinidad por el sustrato (amilosa).

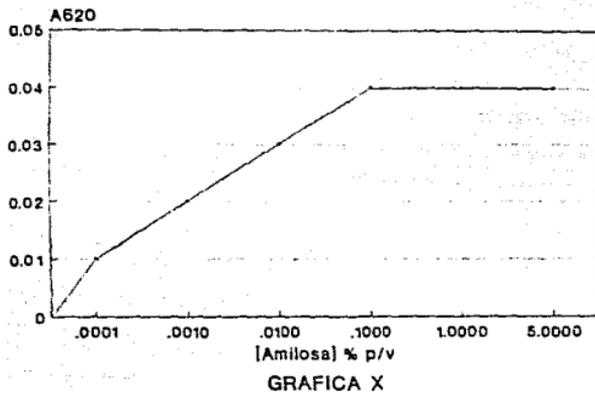
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

17) Determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_m) en condiciones de utilización doméstica.

Axilosa ($\% p/v$)	A_{620}
0.0001	0.01
0.0010	0.02
0.0100	0.03
0.1000	0.04
1.0000	0.04
5.0000	0.04

TABLA XVII. Cinética enzimática de microencapsulados I
(0.4 mg/ml) en condiciones de utilización.

CINETICA ENZIMATICA DE MICROENCAPSULADOS I

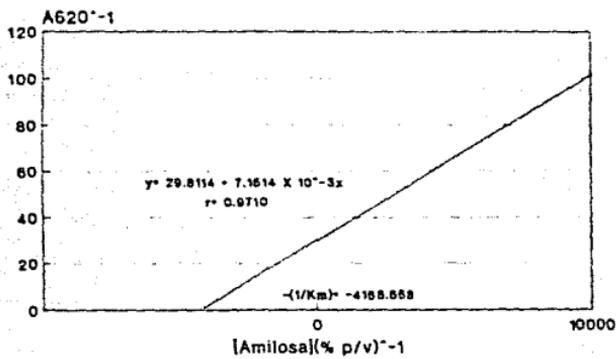


18). Representación de Lineweaver-Burk para calcular Km.

Amilosa (μ p/v) ⁻¹	A ₆₂₀ ⁻¹
10000	100.00
1000	50.00
100	33.33
10	25.00
1.0	25.00
0.2	25.00

TABLA XVIII. Recíprocos de los resultados de la tabla XVII.

REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK
PARA CALCULAR K_m
 $K_m = 2.3990 \times 10^{-4}$



GRAFICA XI

La alfa-amilasa en condiciones de utilización doméstica también se comporta según la teoría de Michaelis-Menten (Tabla XVII, Gráfica X), por lo tanto, Km se calculó de acuerdo al tratamiento de Lineweaver-Burk (Tabla XVIII, Gráfica XI), el valor obtenido en este tratamiento es:

$$K_m = 2.3990 \times 10^{-4}$$

y comparada con la Km en condiciones de laboratorio, es aproximadamente 10 veces mayor, esto significa que en condiciones de laboratorio la enzima presenta mayor afinidad que en condiciones de utilización, sin embargo, en éstas condiciones la enzima encapsulada tiene una actividad y afinidad enzimáticas aceptables.

19) Determinación de pH del agua corriente y de las soluciones de detergente.

Solución (100 ml)	pH
Agua común	7.60
Detergente 90%	9.72
Detergente 95%	10.11
Detergente 99%	10.62

TABLA XIX. Valores de pH para agua común y soluciones de detergente.

En la tabla XIX se muestran los resultados de pH en las diferentes soluciones en las que fueron probadas las actividades enzimáticas tanto para alfa-amilasa, como para proteasa contenidas en los microencapsulados. Estas soluciones tienen una variación que va de un pH neutro a un pH básico, es decir, el pH varía considerablemente, por lo tanto, esta propiedad tampoco es considerada como un factor que altere la actividad enzimática de los microencapsulados y las pequeñas diferencias observadas en las actividades de proteasa y alfa-amilasa se pueden deber a la presencia de ciertos iones tales como Cl^- , Mg^{2+} y principalmente Ca^{2+} .

VII CONCLUSIONES

- 1) Los microencapsulados estudiados tienen actividad de proteasa y alfa-amilasa.
- 2) La actividad enzimática en condiciones de laboratorio es elevada.
- 3) En condiciones de utilización y comparando con las condiciones de laboratorio, la actividad enzimática disminuye conservando un 33%.
- 4) La disminución de la actividad se explica por la disminución de la afinidad de la enzima por el sustrato, debido a cambios conformacionales provocados por ciertos iones del agua.
- 5) Las proteasas microencapsuladas son inespecíficas, esto hace que sean muy útiles en el proceso de lavado.

VIII
BIBLIOGRAFIA

- 1) AINSWORTH, Stanley. Stady-State: Enzyme Kinetics. The MacMillan Press LTD. Londres, 1977.
- 2) ATTWOOD, D. y T. Florence. Surfactant Systems. Chapman & Hall. New York, 1983.
- 3) AUNSTRUP, K. Industrial Aspects of Biochemistry. 30: 23 - 46. 1980.
- 4) AUSTIN, George. Manual de Procesos Químicos en la Industria. 5 ed. Mac Graw Hill, México, 1988.
- 5) BARMAN, Thomas. Enzyme Handbook Vol. 11. Springer-Verlag. New York, 1969.
- 6) BERGEMEYER, Hans. Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie Academic Press. New York, 1963.
- 7) BOHINSKY, Robert C. Bioquímica. Fondo Educativo Interamericano. México, 1987.
- 8) DANEHY, James y Bernard Wolnak. Enzymes: the interface between technology and economics. Marcel Dekker Inc. New York, 1980.
- 9) DELVIN, T. M. Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones. Reverté. Barcelona, 1985.
- 10) DIXON, Malcom. Enzymes. 3 ed. Longman. Londres, 1979.
- 11) DUNN, E. Methods of Measuring Biologically active Enzyme dust In the enviromental air of detergent factories. PergamusPress 21: 1-20. 1978.

- 12) JENCKS, W. P. Adv. Enzymol. Rel. Areas. Mol. Biol. 43: 219-410. 1975.
- 13) LIPSCOMB, William. Ann. Rev. Biochem. 52: 17-54. 1983.
- 14) MAHLER, Henry y Eugene Cordes. Biological Chemistry. 2 ed. Harper & Row. New York, 1971.
- 15) MCALLISTER, Ronald. Las Enzimas y determinación de la actividad enzimática. El Manual Moderno. México, 1975.
- 16) NOVO INDUSTRI. Enzimas deterativas. Dinamarca, 1986.
- 17) NOVO INDUSTRI. Enzimas Novo para detergentes domésticos en polvo. Dinamarca, 1986.
- 18) NOVO INDUSTRI. Enzimas Novo para detergentes líquidos no compuestos de uso doméstico. Dinamarca, 1986.
- 19) NOVO INDUSTRI. Enzimas Novo para la industria de detergentes. Dinamarca, 1989.
- 20) NOVO INDUSTRI. Savinase/BAN-Application In Household Detergents. Dinamarca, 1989.
- 21) ROODYN, D. B. Análisis Automatizado de Enzimas. El Manual Moderno. México, 1975.
- 22) SCHWARTZ, Anthony y James W. Perry. Surface active agents and detergents. Vol II. Interscience Publishers Inc. New York, 1958.
- 23) TRADOS, Thomas. Surfactants. Academic Press. Londres, 1979.

- 24) WINGARK, Lemuel, Ephraim Katchalskikatzir y León Goldstein.
Applied Biochemistry and Bioengineering. Vol II: Enzyme
Technology. Academic Press. Londres, 1979.