

18  
25



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN



# **MANUAL DEL P.T. DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
INGENIERO EN ALIMENTOS  
**P R E S E N T A**  
**LUIS ANTONIO MONDRAGON MILLAN**

ASESOR: I.B.O. J. FRANCISCO MONTIEL SOSA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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**

---

INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS	8
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
OBJETIVOS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS PARTICULARES	18
<b>CAPITULO I</b>	
<b>MARCO DE REFERENCIA DEL P.T. DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO</b>	<b>19</b>
Objetivo General	20
Objetivos Particulares	21
<b>1.1. ASPECTOS GENERALES</b>	<b>23</b>
<i>1.1.1. Información Básica</i>	23
<i>1.1.2. Requisitos Necesarios para Inscribirse</i>	24
<i>1.1.3. Partes que Constituyen el Paquete</i>	24

---

<b>1.2. DESCRIPCIÓN DEL CURSO TEÓRICO</b>	<b>26</b>
<i>Objetivos Particulares</i>	<b>26</b>
<b>1.2.1. Programa del Curso</b>	<b>26</b>
Unidad I "Introducción a la Biotecnología Enzimática"	<b>27</b>
Unidad II "Propiedades de las Enzimas"	<b>28</b>
Unidad III "Procedencia Comercial de las Enzimas Empleadas en Alimentos"	<b>30</b>
Unidad IV "La Extracción y Purificación de Enzimas"	<b>31</b>
Unidad V "Propiedades Cinéticas y Diseño de Reactores"	<b>33</b>
Unidad VI "Inmovilización de Enzimas"	<b>35</b>
Unidad VII "Sensores Basados en Enzimas"	<b>36</b>
Unidad VIII "Modificación de Enzimas"	<b>38</b>
Unidad IX "Aplicación de las Enzimas en la Industria Alimentaria"	<b>39</b>
Unidad X "Perspectivas Futuras"	<b>41</b>
Técnicas de Enseñanza	<b>43</b>
Recursos Didácticos	<b>43</b>
<b>1.3. DESCRIPCIÓN DEL CURSO EXPERIMENTAL</b>	<b>44</b>
<i>Prologo al Trabajo en el Laboratorio</i>	<b>44</b>
<i>Objetivo Particular</i>	<b>46</b>
<i>Objetivos Específicos</i>	<b>47</b>

---

1.3.1. <i>Plan de Trabajo</i>	48
1.3.2. <i>Programa de Actividades</i>	50
1.3.3. <i>Sugerencias Para la Evaluación del Laboratorio</i>	51
1.4. DISEÑO DEL PROYECTO	52
<i>Objetivos Particulares</i>	52
1.4.1. <i>Ubicación del Proyecto</i>	53
1.4.2. <i>Organización del Proyecto</i>	54
1.5. VISITAS	56
<i>Objetivos Particulares</i>	56
1.5.1. <i>Importancia de las Visitas</i>	57
1.6. EVALUACIÓN DEL CURSO DEL P.T. DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO	58
1.6.1. <i>Calificación del Paquete</i>	58

## CAPITULO II

DESARROLLO DE LOS FUNDAMENTOS BÁSICOS DEL CURSO TEÓRICO	60
2.1. UNIDAD I "INTRODUCCIÓN A LA BIOTECNOLOGÍA ENZIMÁTICA"	61
2.1.1. <i>Antecedentes</i>	61
2.1.1.1. <i>Ventajas del Empleo de Enzimas en Comparación con Catalizadores Inorgánicos.</i>	63
2.1.2. <i>Formas de Utilizar a los Biocatalizadores</i>	64

---

2.1.3. Consideraciones Legales Para La Utilización de Enzimas	66
2.1.4. Desarrollo de la Industria Enzimática.	71
2.1.5. Importancia de la Tecnología Enzimática.	74
2.2. UNIDAD II "PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS"	75
Introducción	75
2.2.1. Naturaleza Proteica de casi Todas las Enzimas	75
2.2.2. Especificidad, Clasificación y Nomenclatura	77
2.2.3. Cinética Enzimática	79
2.2.4. Inhibición Enzimática	94
2.2.5. Biosíntesis de Enzimas y Mecanismos de Regulación	101
2.3. UNIDAD III "PROCEDENCIA COMERCIAL DE LAS ENZIMAS EMPLEADAS EN ALIMENTOS"	114
2.3.1. Enzimas Microbianas	115
2.3.2. Control de la Producción Microbiana de Enzimas	116
2.3.3. Técnicas de Manipulación Genética	119
2.3.4. Producción de Enzimas por Técnicas de Ingeniería Genética	120

---

<b>2.4. UNIDAD IV "LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS"</b>	<b>124</b>
2.4.1. <i>Extracción Enzimática</i>	125
2.4.2. <i>Purificación Enzimática</i>	128
2.4.3. <i>Extracción y Purificación a Gran Escala</i>	134
2.4.4. <i>Especificaciones</i>	137
<b>2.5. UNIDAD V "PROPIEDADES CINÉTICAS Y DISEÑO DE REACTORES"</b>	<b>139</b>
2.5.1. <i>Consideraciones Generales</i>	139
2.5.2. <i>Velocidad de Reacción</i>	140
2.5.3. <i>Extensión de la Reacción</i>	143
2.5.4. <i>Aspectos del Diseño de Reactores Enzimáticos</i>	145
<b>2.6. UNIDAD VI "INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS"</b>	<b>157</b>
2.6.1. <i>Introducción</i>	157
2.6.2. <i>Estabilidad Enzimática</i>	157
2.6.3. <i>Inmovilización</i>	161
<b>2.7. UNIDAD VII "SENSORES BASADOS EN ENZIMAS"</b>	<b>156</b>
2.7.1. <i>Enzimas Inmovilizadas</i>	176
2.7.2. <i>Reactores Analíticos</i>	177
2.7.2. <i>Enzimas ligadas a transductores</i>	179
2.7.4. <i>Termistores Enzimáticos</i>	183

---

<b>2.7.5. Interacciones Directas de Enzima-Electrodo</b>	<b>185</b>
<b>2.7.6. Otros Dispositivos Sensores</b>	<b>188</b>
<b>2.8. UNIDAD VIII "APROXIMACIÓN A LA MODIFICACIÓN DE ENZIMAS"</b>	<b>189</b>
<b>2.8.1. Selección de la fuente Aproplada</b>	<b>189</b>
<b>2.8.2. Sustitución de Iones Metálicos Unidos</b>	<b>190</b>
<b>2.8.3. Modificación Covalente de Enzimas</b>	<b>191</b>
<b>2.8.4. Modificación Enzimática de Enzimas</b>	<b>193</b>
<b>2.8.5. Complejos Enzima-Coenzima</b>	<b>194</b>
<b>2.8.6. Mutagénesis no Específica</b>	<b>196</b>
<b>2.8.7. Mutagénesis de sitio Específico</b>	<b>197</b>
<b>2.9. UNIDAD IX "APLICACIONES DE LAS ENZIMAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA"</b>	<b>203</b>
<b>2.9.1. Introducción</b>	<b>203</b>
<b>2.9.2. Consideraciones Económicas</b>	<b>204</b>
<b>2.9.3. Industrias que Utilizan Enzimas</b>	<b>204</b>
<b>2.9.4. Enzimas Indeseables en Alimentos</b>	<b>209</b>
<b>2.9.5. Enzimas Usadas como Parámetros de Control de Calidad</b>	<b>212</b>
<b>2.9.6. Técnicas Indirectas para Determinar la Actividad Enzimática en Diversos Productos Alimenticios</b>	<b>213</b>

---

<b>2.10. UNIDAD X "PERSPECTIVAS FUTURAS"</b>	<b>219</b>
<b>2.10.1. Predicción del Plegamiento/Estructura de la Enzima</b>	<b>220</b>
<b>2.10.2. Utilización de Enzimas En Solventes Orgánicos</b>	<b>223</b>
<b>APENDICE DEL CAPITULO II</b>	<b>227</b>
<b>(AUTOEVALUACION)</b>	
<b>RECOMENDACIONES GENERALES</b>	<b>238</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>240</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>242</b>

---

## **INDICE DE TABLAS, FIGURAS, DIAGRAMAS Y GRÁFICAS**

---

### **TABLAS**

Tabla 1.1. Pruebas de seguridad basadas en la Clasificación de la AMFEP para enzimas utilizadas en la alimentación	70
Tabla 1.2. Preparaciones enzimáticas comercialmente importantes	72
Tabla 2.1. Componentes necesarios en las cinco etapas principales de la síntesis de polipéptidos	113
Tabla 4.1. Efecto del No. de etapas sobre la rentabilidad y costo de un proceso típico de Purificación enzimática	128

### **DIAGRAMAS**

Diagrama 1.1. Partes que constituyen el paquete	25
Diagrama 4.1. Etapas necesarias para la Extracción de una enzima	127
Diagrama 9.1. Extracción del jugo de manzana	207

### **FIGURAS**

Figura 1.1. Distribución de las ventas de enzimas en Europa y E.E.U.U. durante 1975	73
Figura 2.1. Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción enzimática	80
Figura 2.2. Curvas de actividad en función del pH de algunas enzimas	85
Figura 2.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad de una enzima	90

---

<b>Figura 2.4. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de una enzima</b>	<b>92</b>
<b>Figura 2.5. Formas de línea recta de la ecuación de Michaelis-Menten</b>	<b>95</b>
<b>Figura 2.6. Efectos de inhibición competitiva y no competitiva sobre la gráfica de Lineaweaver-Burk</b>	<b>100</b>
<b>Figura 2.7. El código genético</b>	<b>103</b>
<b>Figura 2.8. Operón Lac</b>	<b>104</b>
<b>Figura 2.9. Pasos de la transcripción de la Información Genética</b>	<b>105</b>
<b>Figura 2.10. Activación de los aminoácidos</b>	<b>107</b>
<b>Figura 2.11. Iniciación de la biosíntesis de una enzima</b>	<b>108</b>
<b>Figura 2.12. Etapa de elongación</b>	<b>110</b>
<b>Figura 2.13. Etapa de terminación</b>	<b>111</b>
<b>Figura 2.14. Etapa de plegamiento y transformación</b>	<b>112</b>
<b>Figura 3.1. Operón Lac de E. Coli</b>	<b>118</b>
<b>Figura 3.2. Clonación "shot gun"</b>	<b>121</b>
<b>Figura 3.3. Mapa del plasmido pBR 322</b>	<b>123</b>
<b>Figura 4.1. Homogeneizador de alta presión.</b>	<b>135</b>
<b>Figura 4.2. Diseños básicos de centrifugas industriales</b>	<b>136</b>
<b>Figura 4.3. Diseño básico de un filtro rotatorio</b>	<b>138</b>

---

Figura 5.1. Tipos de reactores enzimáticos	146
Figura 6.1. Representación esquemática de los métodos empleados para la Inmovilización de enzimas	162
Figura 6.2. Consecuencias de la Inmovilización de enzimas	166
Figura 7.1. Aparato para análisis por inyección en flujo	178
Figura 7.2. Un electrodo enzimático sencillo.	181
Figura 7.3. (a) Estructura de una sonda de pH combinada	182
(b) <i>Reacciones de semicelula en una sonda combinada</i>	182
Figura 7.4. (a) Termistor enzimático	184
(b) <i>Sistema de doble termistor</i>	184
Figura 7.5. Célula de combustible bioelectroquímica sencilla	187
Figura 8.1. Efecto de la desaminación de la citosina en la replicación del DNA	198
Figura 8.2. Ciclo de vida del fago M13	200
Figura 8.3. Fagos M13 que contienen DNA recombinante	201
Figura 8.4. Mutagénesis de oligonucleótidos utilizando fagos M13	202

---

<b>Figura 10.1. Secuenciación de polipéptidos utilizando el reactivo de Edman</b>	<b>221</b>
<b>Figura 10.2. Catalisis medida por enzimas en micelas inversas</b>	<b>225</b>
<b>GRÁFICA</b>	
<b>Gráfica 6.1. Gráfico del modulo de THIELE</b>	<b>172</b>

---

## RESUMEN

---

*El presente trabajo tiene como objetivo general elaborar un documento que sirva como material de apoyo para el proceso de enseñanza aprendizaje en las diferentes partes que constituyen la asignatura llamada Paquete Terminal (P.T.) de Enzimas de Uso Alimentario.*

*Para cubrir este objetivo el presente documento se ha dividido en dos capítulos, siendo el primero de ellos, el marco de referencia de la asignatura, o sea este capítulo, nos ubica perfectamente en que es el P.T. de Enzimas, sus requisitos previos, como esta constituido, el numero de profesores que lo imparten, la forma en la cual se trabaja dentro de el y por último nos ubica, en la forma de evaluación y calificación que se sigue en esta asignatura.*

*En el segundo capítulo de este trabajo se hace un desarrollo de los fundamentos básicos del curso teórico, o sea en este capítulo, se encuentran avances de los aspectos más relevantes que contiene el curso de teoría de este paquete terminal.*

---

## INTRODUCCIÓN

---

*Indudablemente, la Biotecnología ha constituido una de las principales áreas de expansión en los campos de la ciencia y la Ingeniería durante los últimos diez a quince años. El advenimiento de nuevas técnicas, con el consiguiente desarrollo de modernos procesos de fabricación, ha sido divulgado no sólo por las revistas científicas, sino también por los medios de comunicación, habiendo llegado a un público mucho más numeroso que el puramente técnico. Desgraciadamente, no todas las esperanzas puestas en las posibilidades potenciales que ofrece la Biotecnología se han basado en un análisis riguroso de las mismas y las expectativas que han despertado constituyen hoy un serio problema. Sin embargo, el área correspondiente a la tecnología enzimática no sólo estaba sólidamente asentada antes de que asistieramos al actual fervor por la Biotecnología, sino que ésta ha contribuido a su desarrollo como entidad y le asegura un futuro prometedor. (15)*

*En realidad, la Biotecnología es de naturaleza multidisciplinaria y abarca diversas áreas, tales como la Tecnología Enzimática, la Microbiología, La Ingeniería Genética, la Química, etcétera. Lo que ofrece un campo sumamente amplio, novedoso y atractivo, con objetivos y métodos muy variados, y con un gran potencial aún inexplorado. Este conjunto de actividades biotecnológicas ha llegado en la actualidad a su fase productiva, en la cual, se busca obtener las mayores utilidades de las investigaciones realizadas, por medio de su aplicación práctica en el procesamiento industrial, utilizando microorganismos y otros agentes biológicos para proporcionar productos y servicios de utilidad social y económica.*

---

*Las Industrias de fermentación, basadas en siglos de experiencia en la producción de cerveza, quesos y similares, han sido la base para la creación de la biotecnología enzimática, ya que por ella se descubrió que los procesos biológicos se realizan en gran medida, mediante reacciones catalizadas por ciertas moléculas de naturaleza proteica conocidas como Enzimas.*

*La Enzimología Industrial se inició en los años cuarenta debido a la necesidad de producir antibióticos suficientes para el tratamiento médico, y con ello, se desarrolló el cultivo de microorganismos en gran volumen, como fuente de las enzimas que se utilizarían Industrialmente.*

*En nuestros días, el uso de enzimas en cerveza, pan, quesos, productos cárnicos, procesamientos textiles, piel y papel, así como detergentes biológicos, es común en todo el mundo.*

*En México, como en otros países, se han realizado estudios importantes sobre tecnología enzimática con la finalidad de contribuir a la consolidación de la capacidad tecnológica y productiva del país. (27)*

*Por lo anteriormente expuesto y como una respuesta a la necesidad imperiosa de involucrar a los estudiantes de Ingeniería en Alimentos con aspectos biotecnológicos, surge la idea de poner en marcha el **Paquete Terminal (P.T.) de Enzimas de Uso Alimentario**, y ofrecerlo a aquellos estudiantes de la carrera que cursaran el noveno semestre. Consideramos que este P.T. además de cumplir con el objetivo de los P.T. que es el de proporcionar a los estudiantes una opción terminal a su carrera, abre una nueva alternativa para aquellos*

---

**estudiantes interesados en la Tecnología y más aún en la Biotecnología, ya que estos aspectos nunca habían sido tocados más a fondo en alguna otra asignatura de la carrera.**

**Creemos que la apertura de este P.T. puede despertar la inquietud de los estudiantes de Ingeniería en Alimentos para adentrarse más en el estudio y la investigación de la biotecnología de enzimas, que hoy en día está en boga y es sin lugar a dudas una alternativa muy viable para la Industrialización de Alimentos en forma más eficiente, saludable y económica.**

**Por otro lado y tomando en cuenta las condiciones actuales en las que se encuentra nuestro país, y de vista al futuro, consideramos que mostrar a los futuros Ingenieros en Alimentos, que la Tecnología es igual de importante que la propia Ingeniería, es fundamental debido a que es necesario para un país como México, contar con gente interesada y dedicada a la implementación de nuevas y más eficientes tecnologías que le permitan competir con países que poseen tecnología avanzada.**

**El P.T. de Enzimas de Uso Alimentario hace una descripción de los antecedentes más importantes, el desarrollo actual y las perspectivas futuras de la Tecnología Enzimática. Se espera que estos conocimientos básicos sobre los usos de las enzimas, su participación, Inmovilización y prácticas industriales en el procesamiento de alimentos, sean de utilidad para aquellos estudiantes que estén interesados en los aspectos biotecnológicos de hoy y en sus aplicaciones futuras.**

---

---

*En esta asignatura de Enzimas de Uso Alimentario, existe la necesidad de crear materiales que apoyen el proceso de enseñanza aprendizaje, esta necesidad se debe a que el mencionado P.T. fue puesto en marcha recientemente (comenzó sus trabajos en el periodo 92-II), por lo cual, requiere de apoyo y trabajo para poder mejorarlo semestre a semestre. Como una respuesta a dicha necesidad, surgió la idea de elaborar un Manual para esta materia. Este manual se ha planeado de tal manera que pueda resultar de gran apoyo tanto a los estudiantes del paquete como a los profesores del mismo, ya que en este documento se engloban los aspectos más relevantes del curso, donde los alumnos podrán sin dificultad alguna, enterarse de los contenidos, actividades, duración, forma de evaluación, etcétera, asimismo, los profesores podrán apoyarse en él para presentar y exponer los temas que marca el programa del paquete.*

*Con este proyecto, tratamos, de dar una herramienta que pueda ser de utilidad en el proceso de enseñanza aprendizaje en este paquete, con la finalidad de lograr un mejor aprovechamiento académico y una mejor preparación profesional de los alumnos de Ingeniería en Alimentos.*

---

# **OBJETIVOS**

---

## **OBJETIVO GENERAL**

Elaborar un manual que englobe los aspectos fundamentales del P.T. de Enzimas de Uso Alimentario, el cual, sirva como material de apoyo para el proceso de enseñanza aprendizaje en esta asignatura.

---

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

*Proporcionar al alumno del P.T. de Enzimas de Uso Alimentario, un documento que le sirva como guía de estudio para esta asignatura.*

*Reunir la información relacionada con las diferentes partes que constituyen el paquete terminal.*

*Formular una serie de preguntas y ejercicios sobre los temas más importantes del curso teórico.*

# CAPITULO I



---

## **OBJETIVO GENERAL DEL P.T.**

Que los alumnos del P.T., conozcan cuáles son las propiedades y aplicaciones principales de las enzimas más importantes para la Industria Alimentaria.

---

## **OBJETIVOS PARTICULARES DEL P.T.**

*Que el alumno compruebe las ventajas que representa el uso de enzimas en la industria de los alimentos.*

*Que el alumno reconozca las propiedades fisico-químicas de las enzimas, así como sus fuentes de obtención.*

*Que el alumno sea capaz de describir las diferentes metodologías utilizadas en la extracción y purificación de las enzimas.*

*Que el alumno determine cuáles son los criterios tanto cinéticos como matemáticos, involucrados en el diseño de un reactor enzimático.*

*Que el alumno contraste las principales técnicas de inmovilización enzimática.*

*Que el alumno compruebe la utilidad y las ventajas que representa usar a las enzimas inmovilizadas.*

---

**Que el alumno aplique sus conocimientos, en el diseño de un proyecto de biotecnología enzimática para la industria alimentaria.**

**Que el alumno del P.T. de Enzimas de Uso Alimentario maneje en el laboratorio prácticas, que le permitan llevar a cabo estudios de extracción, purificación, cuantificación y cinética de algunas enzimas de importancia en alimentos.**

**Por medio de visitas a centros de investigación donde se estudian a las enzimas el alumno esquematizará los conocimientos adquiridos en el salón de clase.**

**El alumno obtendrá una alternativa para la elaboración de su tesis profesional, y con ello, mejorar la eficiencia terminal de la carrera de Ingeniería en Alimentos.**

---

## **1.1 ASPECTOS GENERALES**

---

### **1.1.1 INFORMACIÓN BÁSICA**

Este P.T. se ofrece para los alumnos del 9º semestre de la Carrera de Ingeniería en Alimentos, consta de 30 créditos y es una asignatura teórico práctica. Para la apertura de este P.T. se requiere un mínimo de 7 alumnos y un máximo de 30. Este paquete es impartido por 2 profesores de asignaturas y un ayudante de profesor.

El curso consta de 15 horas semanales de las cuales 3 son para la enseñanza práctica y las 12 restantes son para la parte teórica. Dentro de éste paquete se maneja también la elaboración de un proyecto de biotecnología y se realizan asimismo visitas tanto a industrias como a centros de investigación que trabajan con enzimas.

### **1.1.2 REQUISITOS NECESARIOS PARA INSCRIBIRSE**

El único requisito para que los alumnos de la carrera de Ingeniería en Alimentos puedan inscribirse a este paquete, es que hayan aprobado las siguientes materias:

- a) Microbiología de alimentos.
- b) Bioquímica general.
- c) Ingeniería de Alimentos IV.

Fuera de estas tres materias no se requiere más que el interés del alumno en ingresar al P.T. de Enzimas de Uso Alimentario.

### **1.1.3 PARTES QUE CONSTITUYEN EL PAQUETE**

El P.T. de Enzimas de Uso Alimentario está constituido por cuatro grandes partes, tal como se ilustra diagrama 1.1:

*Diagrama 1.1*

Cada una de estas cuatro partes tiene un peso específico tanto para el aprendizaje como para la calificación del curso, por lo cual las cuatro deben ser tomadas con toda seriedad y responsabilidad.

---

## **1.2 DESCRIPCIÓN DEL CURSO TEÓRICO**

---

---

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

*Que el alumno adquiera las bases teóricas necesarias para que pueda enfrentar con seguridad aspectos prácticos dentro del campo de la biotecnología de enzimas.*

*Que el alumno estime la importancia de la biotecnología enzimática.*

*Que el alumno sea capaz de idear nuevas formas posibles de aplicar la biotecnología enzimática a procesos industriales.*

### **1.2.1 PROGRAMA DEL CURSO**

A continuación se presenta el programa del curso teórico, perfectamente desglosado por unidades, incluyéndose al final de cada unidad la bibliografía seleccionada, así como el tiempo requerido para cubrir los temas que cada unidad marca.

## UNIDAD I

### "Introducción a la Biotecnología Enzimática"

#### *Objetivo Específico:*

*Describir un panorama que permita conocer las diferentes formas de aplicar a las enzimas en el área de alimentos, sus aspectos legales y su situación en el mercado mundial.*

*1.1. Antecedentes*

*1.2. Formas de utilizar a los biocatalizadores*

*1.3. Consideraciones legales para la utilización de enzimas*

*1.4. Desarrollo de la industria enzimática*

*1.5. Importancia de la tecnología enzimática.*

**El tiempo requerido para cubrir esta unidad es de seis horas.**

## BIBLIOGRAFÍA

### A) BÁSICA

- P. Gacesa y J. Hubble, "Tecnología de las Enzimas", Editorial Acribia S.A. 1990, [Clasificación TP248. E57 65318 en F.E.S.C.].

Chaplin And C. Bucke, "Enzyme Technology", Cambridge University, press in N.Y 1990, [Clasificación TP 248.65 E59 en F.E.S.C.].

## B) COMPLEMENTARIA

A. Wiseman, "Manual de Biotecnología de las Enzimas", Editorial Acribia S.A., Zaragoza España 1991 [Clasificación TP 248.ES H3518 en F.E.S.C.].

Reed, "Enzymes in food processing", ed. 2, N.Y. Academic 1975, [Clasificación TX 601/R341975 en F.E.S.C.].

## UNIDAD II "Propiedades de las Enzimas"

### *Objetivo Específico:*

*Revisar las propiedades fisicoquímicas de las enzimas, así como los procesos bioquímicos involucrados en su síntesis.*

*2.1. Naturaleza Proteica de casi todas las enzimas.*

*2.2. Especificidad, Clasificación y Nomenclatura.*

*2.3. Cinética Enzimática.*

*2.4. Inhibición Enzimática.*

2.5. *Biosíntesis de Enzimas (Expresión genética) y mecanismos de regulación.*

**El tiempo requerido para cubrir esta unidad es de diez horas**

**BIBLIOGRAFÍA**

**A) BÁSICA**

Lehninger, A. L. "*Bioquímica*", Editorial Omega, S.A. Séptima reimpresión, Barcelona, 1980 [Clasificación QD415/L4518 en F.E.S.C.].

Stryer L. "*Bioquímica*" 3a. edición. Editorial Reverte 1991 [Clasificación QP514.2 S87 en F.E.S.C.].

**B) COMPLEMENTARIA**

Chaplin and C. Bucke, "*Enzyme Technology*", Cambridge University, press en N.Y., 1990 [Clasificación TP248.65 E59 en F.E.S.C.].

### UNIDAD III

## "Procedencia Comercial de las Enzimas Empleadas en Alimentos"

#### *Objetivos Específico:*

- a) *Presentar las diferentes materias primas usadas en la producción de enzimas empleadas en alimentos, señalando las ventajas de utilizar a aquellas que provienen de microorganismos*
- b) *Conocer los procesos bioquímicos y genéticos que incrementan la producción de enzimas microbianas.*

3.1. *Origen de las Enzimas.*

3.2. *Enzimas Microbianas.*

3.3. *Control de la Producción Microbiana de Enzimas.*

3.4. *Técnicas de Manipulación Genética.*

3.5. *Producción de Enzimas por Técnicas de Ingeniería Genética.*

**El tiempo requerido para cubrir esta unidad es de diez horas**

## BIBLIOGRAFÍA

### A) BÁSICA

P. Gacesa y J. Hubble, "*Tecnología de las Enzimas*", Editorial Acribia, S.A 1990, [Clasificación TP248. E57 63318 en F.E.S.C.].

Chaplin and C. Bucke, "*Enzyme Technology*", Cambridge University, prees in N.Y. 1990, [Clasificación TP248 .65 E59 en F.E.S.C.].

### B) COMPLEMENTARIA

López Munguía Agustín y Quintero Rodolfo, "*Tecnología Enzimática, Aplicaciones en Alimentos y Medicina*", U.N.A.M. 1987, [Clasificación TP248 T4 en F.E.S.C.].

C. M. Brown and I. Campbell "*Introducción a la Biotecnología*" Ed. Acribia S.A. 1990, [Clasificación TP248.2 B7618 en F.E.S.C.].

## UNIDAD IV

### "La Extracción y Purificación de Enzimas"

#### *Objetivo Específico:*

*Describir la metodología utilizada en la extracción y la purificación de las enzimas, y las posibilidades de escalamiento.*

- 4.1. *Extracción enzimática.*
- 4.2. *Purificación enzimática.*
- 4.3. *Extracción y purificación a gran escala.*
- 4.4. *Especificaciones.*

**El tiempo requerido para cubrir esta unidad es de 10 horas.**

## BIBLIOGRAFÍA

### A) BÁSICA

- Lenhninger, A.L., "*Bioquímica*" Ediciones Omega S.A. 7a. reimpresión, Barcelona, 1980, [Clasificación QD415/L4518 en F.E.S.C.].
- Chaplin, and C. Bucke, "*Enzyme Technology*", Cambridge University, press in N.Y., 1990, [Clasificación TP248.65 E59 en F.E.S.C.].
- P. Gacesa y J. Hubble, "*Tecnología de las Enzimas*", ed. Acribia, S.A. 1990, [Clasificación TP248.E57 63318 en F.E.S.C.].

**B) COMPLEMENTARIA**

López Munguía Agustín y Quintero Rodolfo, "*Tecnología Enzimática, Aplicaciones en Alimentos y Medicina*", U.N.A.M 1987, [Clasificación TP248T4 en F.E.S.C.].

A. Wiseman, "*Manual de Biotecnología de las Enzimas*", Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España, 1991, [Clasificación TP248. ES H3518 en F.E.S.C.].

**UNIDAD V**

**"Propiedades Cinéticas y Diseño de Reactores"**

*Objetivo Específico*

*Presentar los criterios cinéticos y matemáticos que se deben considerar en el diseño de reactores enzimáticos.*

*5.1. Consideraciones generales.*

*5.2. Velocidad de reacción.*

*5.3. Extensión de la reacción.*

*5.4. Aspectos del diseño de reactores.*

**El tiempo requerido para cubrir esta unidad es de doce horas**

## BIBLIOGRAFÍA

### A) BÁSICA

P. Gacesa y J. Hubble, "*Tecnología de las Enzimas*", Ed. Acribia, S.A, 1990, [Clasificación TP248. E57 63318 en F.E.S.C.].

Quintero Ramírez Rodolfo, "*Ingeniería Bioquímica Teoría y Aplicaciones*", Ed. Alhambra Mexicana 1981, [Clasificación TP 248.3 Q84 en F.E.S.C.].

López Munguía Agustín y Quintero Rodolfo, "*Tecnología Enzimática, Aplicaciones en Alimentos y Medicina*", U.N.A.M. 1987, [Clasificación TP248 T4 en F.E.S.C.].

### B) COMPLEMENTARIA

Atkinson B., "*Reactores Bioquímicos*", Ed. Reverte S.A., España 1986, [Clasificación TP157 A7518 en F.E.S.C.].

A. Wiseman, "*Manual de Biotecnología de las Enzimas*", Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España 1991, [Clasificación TP248. ESH3518 en F.E.S.C.].

## UNIDAD VI "Inmovilización de Enzimas"

### *Objetivo Específico:*

*Analizar los fundamentos que implican las diversas técnicas que permiten lograr la inmovilización en enzimas, presentando las ventajas y algunas enzimas que se utilizan en esta forma:*

6.1. *Introducción.*

6.2. *Estabilidad enzimática.*

6.3. *Inmovilización.*

**El tiempo requerido para cubrir esta unidad es de diez horas.**

### **BIBLIOGRAFÍA:**

#### **A) BÁSICA**

P. Gacesa y J. Hubble, "*Tecnología de las Enzimas*", Ed. Acribia, S.A., 1990, [Clasificación TP248.E563318 en F.E.S.C.].

Chaplin and C. Bucke, "*Enzymes Technology*", Cambridge University, press in N.Y. 1990, [Clasificación TP248.65 E59 en F.E.S.C.].

López Munguía Agustín y Quintero Rodolfo, "*Tecnología Enzimática, Aplicaciones en Alimentos y Medicina*", U.N.A.M. 1987, [Clasificación TP248 T4 en F.E.S.C.].

## B) COMPLEMENTARIA

Quintero Ramírez Rodolfo, "*Ingeniería Bioquímica, Teoría y Aplicaciones*", Ed. Alhambra Mexicana, 1981, [Clasificación TP 248.3 Q84 en F.E.S.C.].

C.M. Brown and I. Campbell, "*Introducción a la Biotecnología*", Ed. Acribia 1990, [Clasificación TP248.2 B7618 en F.E.S.C.].

## UNIDAD VII

### "Sensores Basados en Enzimas"

*Objetivo Específico:*

*Ilustrar la utilidad y los fundamentos de utilizar a las enzimas ligadas a transductores.*

*7.1. Enzimas inmovilizadas.*

*7.2. Reactores analíticos.*

*7.3. Enzimas ligadas a transductores.*

7.4. *Termistores enzimáticos.*

7.5. *Interacciones directas de enzimas-electrodo.*

7.6. *Otros dispositivos sensores.*

**El tiempo requerido para cubrir esta unidad  
es de ocho horas.**

## **BIBLIOGRAFÍA**

### **A) BÁSICA**

- A. Wiseman, "*Manual de Biotecnología de las Enzimas*", Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España 1991, [Clasificación TP248.ES H3518 en F.E.S.C.].
- P. Gacesa y J. Hubble, "*Tecnología de las Enzimas*", Ed. Acribia, S.A. 1990, [Clasificación TP248 E5 63318 en F.E.S.C.].

### **B) COMPLEMENTARIA**

- Quintero Ramírez Rodolfo, "*Ingeniería Bioquímica, Teoría y Aplicaciones*", Ed. Alhambra Mexicana, 1981, [Clasificación TP 248.3 Q84 en F.E.S.C.].

C.M. Brown and I. Campbell, "Introducción a la Biotecnología", Ed. Acribia, S. A. (1990) [Clasificación TP248.2 B7618 en F.E.S.C.].

## UNIDAD VIII "Modificación de Enzimas"

*Objetivo Específico:*

*Enunciar las diferentes modificaciones que puede sufrir una enzima lo que permite incrementar su actividad y estabilidad catalítica.*

- 8.1. Selección de la fuente apropiada.*
- 8.2. Sustitución de iones metálicos.*
- 8.3. Modificación covalente de enzimas.*
- 8.4. Modificación enzimática de enzimas.*
- 8.5. Complejos enzima-coenzima.*
- 8.6. Mutagénesis no específica.*
- 8.7. Mutagénesis de sitio específico.*

**El tiempo requerido para cubrir esta unidad es de ocho horas.**

## BIBLIOGRAFÍA

### A) BÁSICA

Chaplin and C. Bucke, "*Enzyme Technology*", Cambridge University, press in N.Y. 1990, [Clasificación TP248.65 E59 en F.E.S.C.].

P. Gacesa y J. Hubble, "*Tecnología de las Enzimas*", Ed. Acribia, S.A. 1990, [Clasificación TP248. E5 63318 en F.E.S.C.].

### B) COMPLEMENTARIA

C. M. Brown and I Campell, "*Introducción a la Biotecnología*", Ed. Acribia S.A. 1990, [Clasificación TP 248.2 B7618 en F.E.S.C.]

## UNIDAD IX

### "Aplicaciones de las Enzimas en la Industria Alimentaria"

#### *Objetivo Específico*

*Distinguir las enzimas más utilizadas en la industria alimentaria, señalando los diferentes cambios que efectúan y las ventajas económicas que esto representa.*

#### *9.1. Introducción.*

#### *9.2. Consideraciones económicas.*

*9.3. Industrias que utilizan enzimas:*

- Jugos
- Panadería
- Jarabes
- Lácteos
- Proteica
- Azucarera
- Fermentaciones
- Bebidas estimulantes
- Cárnica
- Del huevo
- Aceite
- Otras aplicaciones.

Para observar como se debe de cubrir este punto ver página 204

*9.4. Enzimas indeseables en alimentos.*

*9.5. Enzimas usadas como parámetros de control de calidad.*

*9.6. Técnicas indirectas para determinar la actividad enzimática en diversos productos alimenticios.*

**El tiempo requerido para cubrir esta unidad es de 14 horas.**

## BIBLIOGRAFÍA

### A) BÁSICA

Alvarez F. R., Arroyo N.G., Montiel S.J.F., "*Técnicas Indirectas para Medir la Actividad Enzimática en Alimentos*", F.E.S.C. U.N.A.M. 1991, [Clasificación 105-29 003/91 en F.E.S.C.].

Badui Dergal Salvador, "*Química de los Alimentos*", Ed. Alhambra, 5a. edición 1989, [Clasificación TX545B33 en F.E.S.C.].

### B) COMPLEMENTARIA

López Munguía Agustín y Quintero Rodolfo, "*Tecnología Enzimática, Aplicaciones en Alimentos y Medicina*", U.N.A.M. 1987, [Clasificación TP248 T4 en F.E.S.C.].

Reed, "*Enzymes in food Processing*", Ed. 2, N.Y. 1975, [Clasificación TX601/R341975 en F.E.S.C.].

## UNIDAD X

### "Perspectivas Futuras"

#### *Objetivo Específico:*

*Verificar nuevos aspectos de las enzimas que se encuentran en estudio y que permitan mejorar la Biotecnología de estos catalizadores.*

10.1. *Predicción del Plegamiento/Estructura de la enzima.*

10.2. *Utilización de las enzimas en solventes orgánicos.*

**El tiempo requerido para cubrir esta unidad es de seis horas.**

## BIBLIOGRAFÍA

### A) BÁSICA

P. Gacesa y J. Hubble, "*Tecnología de las Enzimas*", Ed. Acribia, S.A., 1990, [Clasificación TP248.E5 63318 en F.E.S.C.].

A. Wiseman, "*Manual de Biotecnología de las Enzimas*", Ed. Acribia S.A 1991 [Clasificación TP248. ES H3518 en F.E.S.C.].

### B) COMPLEMENTARIA

- C. M. Brown and I. Campbell, "*Introducción a la Biotecnología*", Ed. Acribia S.A. 1991, [Clasificación TP248.2 B7618 en F.E.S.C.].

**Nota:** En el capítulo II de éste mismo manual se encuentran avances de los aspectos más relevantes de los temas de cada unidad.

### **TÉCNICAS DE ENSEÑANZA**

- Conferencias
- Seminarios de discusión
- Dinámicas de grupo
- Mesas redondas

### **RECURSOS DIDÁCTICOS**

- Resolución de Ejercicios
- Gis y pizarrón
- Material audiovisual
- Acetatos
- Diaporamas

---

## 1.3 DESCRIPCIÓN DEL CURSO EXPERIMENTAL

---

### PROLOGO AL TRABAJO EN EL LABORATORIO

El P.T. de Enzimas de Uso Alimentario, contempla el aspecto teórico y el práctico, este último pretende apoyar, motivar, impulsar, y desarrollar al alumno, en los conocimientos y metodologías fundamentales para trabajar en el campo de las ENZIMAS.

En virtud de la reciente apertura de este P.T., se ha considerado posible estandarizar algunas metodologías elementales para iniciar el estudio de las Enzimas; estas contemplan: Procesos de *extracción, purificación y cuantificación* de ellas a partir de fuentes naturales (Alimentos). Así también, los procedimientos para realizar estudios de cinética enzimática considerando diversas variables que están sujetas a modificaciones semestre a semestre en relación al conocimiento, discusión y selección de metodología por los estudiantes del paquete.

Por otro lado queremos hacer saber que este laboratorio contempla una Guía metodológica que puede adaptarse a las sugerencias y modificaciones argumentadas científicamente por los alumnos, con el objetivo de que el alumnado participe para establecer *¿que?, ¿como?, y ¿cuando?* cubrirá los objetivos establecidos para cada práctica.

Este modelo de enseñanza experimental, le presenta al alumno otra forma de trabajo, en la cual la enseñanza experimental esta vinculada con la enseñanza teórica, lo que permite al alumno, desarrollar, aplicar, analizar, sintetizar y evaluar sus conocimientos, asimismo y en virtud de que actualmente ninguno de los laboratorios únicos (LEM) ha revisado aspectos experimentales de la biotecnología de enzimas, este laboratorio pretende cubrir estos aspectos hasta hoy un poco olvidados en el sistema de laboratorio de estudios multidisciplinarios.

Es importante aclarar que en este punto sólo se presenta un panorama muy general de lo que es la enseñanza práctica dentro del paquete teniendo necesariamente que complementar ésta parte recurriendo a la información particular que sobre el trabajo en el laboratorio existe.

## **OBJETIVO PARTICULAR**

*Que el alumno utilice los procedimientos experimentales de que se dispone para extraer, purificar y cuantificar ENZIMAS, cuya fuente natural sean alimentos*

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

*Describir a los alumnos del P.T. de Enzimas los aspectos básicos de cuantificación, extracción y purificación de enzimas en forma práctica.*

*Que el alumno pueda aplicar eficientemente métodos de extracción, separación y purificación de enzimas.*

*Que el alumno utilice e identifique, los equipos, instrumentos y materiales básicos que con mayor frecuencia se utilizan para realizar estudios enzimáticos.*

*Que el alumno proponga en base a los conocimientos adquiridos, las modificaciones al procedimiento metodológico que se le proporciona, para que establezca sus objetivos personales o de grupo. Así como las modificaciones a la metodología y que lo realice prácticamente.*

*Que el alumno evalúe los resultados experimentales obtenidos y que los discuta en grupo, para establecer las condiciones óptimas de cada enzima.*

*Que al finalizar el curso, el alumno pueda proyectar nuevos modelos de experimentación o modificaciones a los existentes, con la finalidad de mejorar el curso experimental semestre a semestre.*

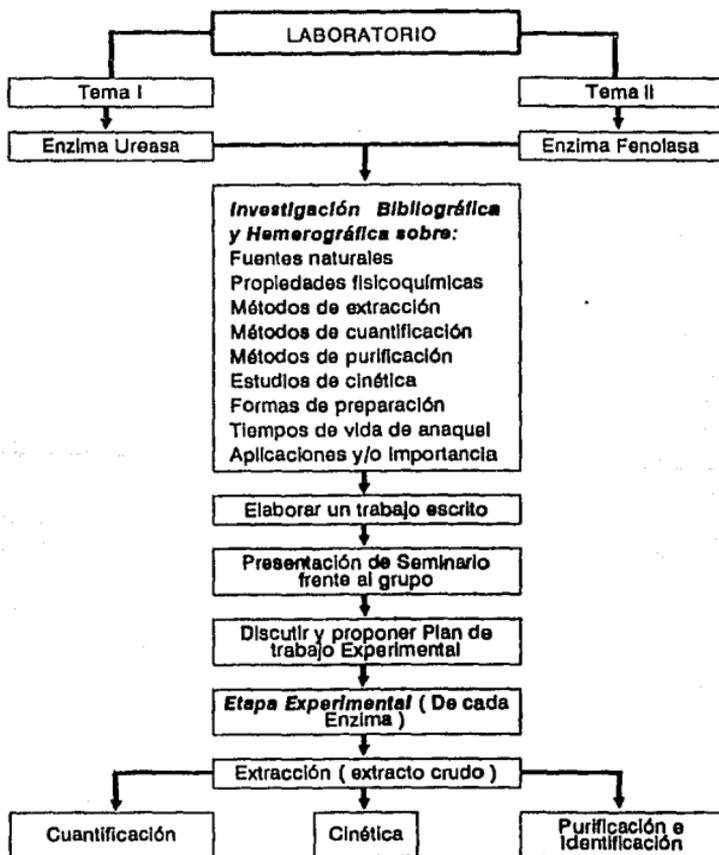
### 1.3.1 PLAN DE TRABAJO

Para el trabajo en el laboratorio se usarán dos enzimas que serán: Ureasa y polifenoloxidasa, debido a que la metodología para realizar el estudio de estas enzimas se tiene perfectamente estandarizada y comprobada. Por otro lado la infraestructura que existe hoy día en el laboratorio del paquete no permite el trabajo óptimo con alguna otra enzima, aclarando que se esta planeando implementar nuevas metodologías con otras enzimas de mayor interés en alimentos.

A las dos enzimas antes mencionadas se les harán los siguientes estudios:

- a) *Extracción.*
- b) *Cuantificación.*
- c) *Cinética.*- Evaluación del efecto de los siguientes parámetros sobre la velocidad de reacción:
  - Efecto del pH
  - Efecto de la temperatura
  - Efecto de la concentración del sustrato
  - Efecto del tiempo
  - Efecto de la concentración de la enzima
  - Efecto de algunos inhibidores (SO<sub>3</sub>Na, Ac. bórico, HgCl<sub>2</sub>, Nitrato de Plata, Calor, etcétera).
- d) *Purificación.*
- e) *Identificación.*

A continuación se muestra un cuadro metodológico que ilustra el plan de trabajo a llevar dentro del laboratorio, siguiendo el método científico.



### 1.3 DESCRIPCIÓN DEL CURSO EXPERIMENTAL

#### 1.3.2. PROGRAMA DE ACTIVIDADES

En el cuadro que se presenta a continuación se describen las actividades a realizar en el laboratorio por cada sección experimental. Cabe aclarar que cada sesión consta de 4 horas.

SECCIÓN N <sup>o</sup> .	ACTIVIDAD
1	Inscripción y presentación del curso de laboratorio del P.T. de enzimas.
2 y 3	Busqueda de información bibliográfica
4	Seminario de presentación del tema I "Enzima Ureasa".
5	<b>Práctica No. 1</b> Extracción y Cuantificación de la Ureasa.
6 y 7	<b>Práctica No. 2</b> Conocer la Cinética de la enzima Ureasa.
8	<b>Práctica No. 3</b> Purificación de la enzima Ureasa.
9	Seminario de discusión del tema I.
10	Seminario de presentación del tema II "Enzima Fenolasa".
11	<b>Práctica No. 1</b> Extracción y Cuantificación de fenolasa.
12 y 13	<b>Práctica No. 2</b> Conocer la Cinética de la enzima Fenolasa.
14	<b>Práctica No. 3</b> Purificación de la enzima Fenolasa.
15	Seminario de discusión del tema II.
16	Examen final (Temas I y II).
17	Entrega de calificaciones.*

\* Nota: Para tener derecho a calificación del curso del laboratorio el alumno debe tener como mínimo el 80% de asistencias.

### 1.3.3. SUGERENCIAS PARA LA EVALUACIÓN DEL LABORATORIO

Dadas las observaciones realizadas por los profesores del laboratorio del P.T. de Enzimas y después de hacer un censo con los estudiantes egresados de este paquete se sugiere que el laboratorio sea evaluado de la siguiente forma:

Trabajo en el laboratorio	30%	Individual
Seminarios	20%	Equipo
Reportes	30%	Individual
Examen	20%	Individual

Consideramos que evaluando de esta forma a los estudiantes se logra despertar un mayor interés y responsabilidad en ellos hacia el curso experimental, obteniéndose con ello mejores resultados en cuanto al aprendizaje y aprovechamiento académico.

---

## **1.4 DISEÑO DEL PROYECTO**

---

---

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

*Que el alumno del P.T. utilice todos sus conocimientos tanto teóricos como prácticos, para la elaboración de un proyecto que le permita conocer más a fondo cuestiones como; propiedades, aplicaciones, cinética, inhibidores, y posible aplicación real de una enzima en particular en algún proceso de industrialización de alimentos.*

*Que el alumno organice los conocimientos obtenidos en clase al estarlos manejando y aplicando en sus proyectos.*

*Que mediante este proyecto el alumno sea capaz de innovar o mejorar algún proceso industrial de su interés, mediante el uso de la enzima de su elección.*

*Proponer al alumno la posibilidad de continuar su proyecto después de terminado el curso, para que éste pueda ser registrado como su tesis profesional.*

### 1.4.1 UBICACIÓN DEL PROYECTO

Hoy en día, el P.T. de Enzimas de Uso Alimentario, cuenta con tres líneas de investigación y desarrollo de proyectos que son:

- a) Inmovilización de enzimas y diseño de reactores enzimáticos.
- b) Extracción y purificación de enzimas.
- c) Nuevas y futuras aplicaciones de enzimas en alimentos.

El proyecto que cada estudiante decida diseñar debe ser clasificado dentro de alguna de las tres líneas antes mencionadas, ya que consideramos que estas líneas son de relevancia y trascendencia, hoy en día en la tecnología de enzimas. La intención de esto es hacer que los estudiantes centren sus esfuerzos en diseñar un proyecto que resulte novedoso y que pueda tener aplicación en los procesos biotecnológicos de interés en el presente.

**1.4.2. ORGANIZACIÓN DEL PROYECTO**

El proyecto además de cumplir con los objetivos generales que se enunciaron anteriormente, debe cumplir con ciertos contenidos mínimos, que son los siguientes puntos:

- a) Portada**
- b) Índice**
- c) Introducción**
- d) Objetivo General**
- e) Objetivos Particulares**
- f) Justificación**
- g) Cuadro metodológico**
- h) Diseño Experimental (Si es que contara con una parte práctica)**
- l) Desarrollo del Proyecto**
- j) Resultados y discusión**
- k) Conclusiones**
- l) Glosario (de ser necesario)**
- m) Bibliografía (anexando los artículos consultados)**

**IMPORTANTE:**

El proyecto deberá realizarse desde el inicio del curso, presentando periódicamente el avance que se tenga al asesor correspondiente, ya que la evaluación final del proyecto se obtendrá del promedio de los siguientes rubros:

- a) Seminario de Presentación
- b) Entrega preliminar
- c) Entrega definitiva
- d) Seminario de evaluación.

Debido a esto es importante no descuidar ninguno de los rubros anteriores para que, tanto la calidad como la calificación del proyecto, no demerite y resulte así un proyecto viable de ser continuado como **Tesis profesional**.

---

## 1.5 VISITAS

---

### OBJETIVOS PARTICULARES

*Ilustrar al alumno del P.T. las diferentes técnicas y métodos de utilización industrial de enzimas.*

*Que los alumnos del P.T. analicen una industria que se dedique a la producción de enzimas a gran escala, con la finalidad de que observen los equipos, técnicas y procedimientos que se utilizan para la producción de estos catalizadores biológicos.*

*Que los alumnos visiten una industria de alimentos en la que se usen enzimas para producir o mejorar la presentación y apariencia de sus productos, con la finalidad de que los alumnos de P.T. puedan observar la forma práctica donde se aplican y controlan las enzimas.*

*Localizar un centro de investigación que se dedique a la búsqueda de nuevas técnicas y tecnologías para la producción y la aplicación de las enzimas en nuevos procesos, y esto con la finalidad de que los alumnos comprendan la vinculación de la investigación tecnológica y su aplicación industrial.*

### 1.5.1. IMPORTANCIA DE LAS VISITAS

Es necesario dejar bien puntualizado que las visitas tienen una importancia radical en la formación del alumno en el área de la biotecnología enzimática, debido a que en estas visitas se acude a observar en la realidad como se llevan a cabo procesos importantísimos en cuanto al uso y trabajo con enzimas. El primero de estos procesos de interés que acudimos a observar es como algunas plantas industriales logran la producción y comercialización de enzimas a gran escala, donde nos interesa ver las técnicas y métodos utilizados para la extracción, purificación, envasado y comercialización de las enzimas.

El segundo punto de interés es el poder ser testigos de la forma en la cual algunas industrias aplican enzimas o tratamientos enzimáticos en sus procesos de producción con la finalidad de lograr alguna biotransformación específica o lograr una mejor presentación final de su producto (industrias de jugos, panificación, vinos, lácteos, etcétera).

Por último el tercer rubro importante para nosotros es el conocer centros de investigación que estén trabajando con enzimas donde podamos analizar los proyectos que en el terreno enzimático se estén llevando a cabo, esto con la finalidad de crearnos un panorama general de lo importante que resulta actualmente el encontrar nuevas y mejores formas de utilizar a las enzimas en la industria alimentaria.

Por lo expuesto anteriormente éstas visitas son de gran valía y utilidad para los estudiantes de este paquete.

**Nota:** Las visitas serán evaluadas mediante la resolución de cuestionarios que resultan obligatorios, y sin excusa ni pretexto todos y cada uno de los estudiantes del P.T. deben resolverlos correctamente.

---

## **1.6 EVALUACIÓN DEL CURSO DE P.T. DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO**

---

La evaluación que cada alumno del paquete reciba será basandose en todos aquellos aspectos importantes para el proceso enseñanza aprendizaje, como son: cumplimiento de tareas, trabajos y seminarios, asistencia y puntualidad a las clases tanto teóricas como prácticas, así como a las visitas, o sea en general le será evaluado el interés y preocupación que muestre hacia la asignatura.

### **1.6.1. CALIFICACIÓN DEL PAQUETE**

La calificación final que recibirá cada alumno del P.T. se obtendrá sumando el porcentaje que obtenga en:

- a) Proyecto**
- b) Curso teórico**
- c) Curso experimental.**

El porcentaje de cada una de estas partes será el siguiente:

PROYECTO	40%
CURSO TEÓRICO	30%
CURSO EXPERIMENTAL	30%

Es importante aclarar que el alumno que no acredite el laboratorio o el proyecto o no resuelva correctamente los cuestionarios sobre lo observado en las visitas, no tendrá derecho a presentar exámenes ordinarios (A,B). Por lo que se considerará automáticamente como no acreditado.

En general, esta es la forma en que se evaluará el curso del P.T. de Enzimas.

# CAPITULO II

DESARROLLO DE  
LOS FUNDAMENTOS  
BASICOS DEL  
CURSO  
TEORICO



*A continuación se presenta el desarrollo de los aspectos fundamentales de cada unidad que contiene el curso Teórico. Se recomienda al alumno leer y revisar estos fundamentos antes de ser tocados en clase, para que con esto logre un mejor entendimiento y aprendizaje de cada uno de los temas a discutir.*

## **2.1 UNIDAD I**

### **INTRODUCCIÓN A LA BIOTECNOLOGÍA ENZIMÁTICA**

#### **2.1.1. ANTECEDENTES**

La utilización de los sistemas biológicos para llevar a cabo transformaciones químicas apropiadas tiene una larga tradición, que comenzó muchos años atrás, con aspectos tan destacados como: la conversión de leche en queso y la fermentación de soluciones azucaradas en bebidas alcohólicas. Desde que estos sencillos procesos se utilizaron por primera vez, es evidente que nuestro concepto de biotecnología ha cambiado radicalmente, sin embargo, la producción del pan, el queso y el alcohol se encuentran todavía entre las aplicaciones más significativas de esta ciencia.

ATKINSON en 1974 divide cronológicamente el desarrollo de la biotecnología en la manera en que se ilustra en el siguiente cuadro.

## DESARROLLO DE LOS FUNDAMENTOS BÁSICOS DEL CURSO TEÓRICO

Antes de 1800	Se utilizan algunos procesos biológicos, pero se desconoce por completo el mecanismo de acción de estos procesos.
Entre 1800 y 1900	Periodo de descubrimientos, proporcionando conocimientos importantes sobre los mecanismos de acción que hacen posible las biotransformaciones.
Después de 1900	Periodo de un desarrollo industrial y de los conocimientos de cinética enzimática (Michaelis-Menten).
*Después de 1970	Periodo de modificaciones biológicas específicas realizadas en forma directa por técnica de Ingeniería genética.

\* Época actual no propuesta por ATKINSON, pero fundamental en el desarrollo de la biotecnología (15).

Los orígenes históricos de la tecnología enzimática se remontan al segundo periodo (1800-1900). Durante el mismo, se demuestra la capacidad de los tejidos biológicos para llevar a cabo transformaciones químicas.

En 1878 se introduce por primera vez el término <enzimas> y posteriormente se registran los primeros intentos para establecer una nomenclatura sistemática, los cuales, condujeron a utilizar el sufijo <asa> añadido al nombre del sustrato. Durante esta etapa de investigación, se establecieron los conceptos de especificidad, requerimiento de coenzima y existencia de enzimas en sistemas libres de células. Estos hallazgos prepararon el camino tanto para la

descripción cinética de la actividad enzimática realizada por Michaelis-Menten en 1913, como para la obtención de la primera enzima en forma pura la "UREASA" obtenida por Summer en 1926. (15)

En 1900 se demostró por primera vez la posibilidad de inmovilizar enzimas, mediante la absorción de extractos de levadura sobre carbón activo. En 1953 se desarrollan los métodos para unir covalentemente enzimas a resinas de poliestireno. (8,15)

Durante los años de 1960 y 1970 creció enormemente el uso de enzimas inmovilizadas, con un amplio rango de aplicaciones, las cuales, se mencionaran posteriormente en este mismo manual. Cabe mencionar, que la biotecnología se desarrolla y avanza día con día, lo que la hace ser una disciplina sumamente interesante y con un potencial enorme tanto presente como futuro.

#### **2.1.1.1. VENTAJAS DEL EMPLEO DE ENZIMAS EN COMPARACIÓN CON CATALIZADORES INORGÁNICOS**

El uso de un catalizador biológico como lo es una "enzima" representa muchas ventajas para el proceso de producción en el cual se utilice, a continuación se mencionaran algunas de esas ventajas:

- Alto poder catalítico (dos a tres veces mayor que los catalizadores inorgánicos)
- Alta especificidad

- Funcionan en condiciones moderadas de pH y temperatura, con lo cual se reducen los costos del proceso.
- Requieren de un pequeño espacio de operación (reactores o fermentadores de cualquier volumen deseado)
- Reutilización al inmovilizarlas, bajando así los costos de producción
- Fáciles de producir y mejorar por técnicas de ingeniería genética
- Son "no tóxicas" por ser productos naturales (8,15,46)

### **2.1.2. FORMAS DE UTILIZAR A LOS BIOCATALIZADORES**

Aunque para efectuar biotransformaciones es posible utilizar tejidos completos, vegetales o animales, es conveniente limitar el campo donde se llevará a cabo la biotransformación, por lo cual, aquí se discutirá sobre la conveniencia del uso de los métodos de: *fermentación microbiana, células libres e inmovilizadas y enzimas inmovilizadas.*

#### **FERMENTACIÓN MICROBIANA**

Se utiliza un *microorganismo* para lograr la síntesis de un metabolito, se puede utilizar un reactor donde se tiene al microorganismo, a este reactor se le adiciona continuamente medio de cultivo, por lo que podemos tener una fermentación en continuo. Las enzimas así producidas requieren de una posterior purificación lo que eleva su costo de obtención.

### **CÉLULAS LIBRES**

En estos procesos se utilizan células *animales y/o vegetales*. En los procesos biotecnológicos realizados a gran escala, las fermentaciones con células libres constituyen todavía el método más utilizado. Su manipulación es relativamente fácil y, en algunos casos, no requiere de un medio de cultivo estéril. Este proceso es especialmente idóneo para aquellos procesos de producción de compuestos complejos que requieren un proceso de síntesis de varias etapas, la gran desventaja aquí es la producción de compuestos secundarios indeseables, los cuales, deben separarse posteriormente aumentando así el costo de producción. Este hecho, junto con la producción con un exceso de biomasa limita el rendimiento del medio de cultivo y, por consiguiente, la economía del proceso.

### **CÉLULAS INMOVILIZADAS**

Este proceso puede considerarse como un estado intermedio entre la fermentación, las células libres y las enzimas inmovilizadas. De forma general, debemos decir que las células inmovilizadas deben utilizarse en aquellos casos en los que intervienen varias etapas enzimáticas. Por otro lado, pueden llevar a cabo procesos que transcurren con gasto de energía, pero la duración de los mismos estará siempre limitada por la reserva energética de la célula.

### **ENZIMAS INMOVILIZADAS**

Al tener una enzima inmovilizada se logra una alta actividad (en la mayoría de los casos), y una gran especificidad, lograndose así eliminar el problema de la formación de sub-

productos indeseables. Al tener una enzima inmovilizada, esta puede ser utilizada muchas veces en el proceso reflejándose esto en una disminución del costo de producción, en cuanto al catalizador se refiere. Como contrapartida a estas ventajas se encuentra el hecho de que purificar e inmovilizar enzimas resulta un proceso caro. Por otro lado, cada enzima tiene un pH óptimo diferente y una estabilidad distinta frente a la temperatura, por lo que los problemas se multiplican cuando se planifica un proceso de síntesis que transcurre en varias etapas. (15,45)

Es importante aclarar que de todos los factores mencionados el factor de mayor influencia para la elección del catalizador será el costo económico.

### **2.1.3. CONSIDERACIONES LEGALES PARA LA UTILIZACIÓN DE ENZIMAS**

El criterio de viabilidad económica de un proceso está estrechamente relacionado con las normas legislativas que rigen tanto para las operaciones que lo componen como para la pureza del producto final. En el caso de materiales biológicos existen varias áreas que representan un riesgo potencial de efectos nocivos:

- 1) Microbiológica
- 2) Toxicidad química
- 3) Toxicidad relacionada con la actividad enzimática

**1) MICROBIOLÓGICA**

Los problemas derivados de la actividad microbiológica dependerán del organismo elegido como materia de partida y deberán reflejarse en las medidas de seguridad incorporadas al proceso de producción. Los productos destinados a ser consumidos en el mercado necesitarán cumplir todos los criterios de pureza, los cuales, aseguran que no han estado sujetos a peligrosas contaminaciones microbianas. (8,15)

**2) TOXICIDAD QUÍMICA**

Esta procede normalmente de contaminaciones provocadas por sustancias producidas en el metabolismo secundario de microorganismos por ejemplo, micotoxinas y aflatoxinas. En la actualidad, la existencia de un mayor conocimiento sobre las consecuencias a largo plazo de estas toxinas a llevado a establecer un control legislativo más severo en este campo. (8,15)

**3) TOXICIDAD RELACIONADA CON LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

Esta toxicidad se ilustra claramente con el ejemplo que ofrecen las enzimas proteolíticas utilizadas para la producción de detergentes biológicos. Al inhalar el polvo que contienen estas enzimas, se puede dañar la superficie de los bronquiolos pulmonares produciendo irritación en los mismos y alteraciones respiratorias. Las enzimas proteolíticas muy activas, pueden tener un poder de degradación semejante al de las soluciones fuertemente cáusticas, por lo que se deben tomar precauciones con su manejo. (8,15)

Como ya se ha indicado en las primeras etapas de la producción enzimática, estas proteínas se encuentran en polvo muy fino, generalmente dando lugar a que además de ser inhaladas, tomen contacto con la piel provocando reacciones alérgicas que se manifiestan con fiebre. Estas reacciones alérgicas tenderán a ser más enérgicas en sucesivas reexposiciones y pueden ser peligrosas e incluso de fatales consecuencias en condiciones extremas. (8,15)

Dado lo riesgoso que puede resultar el usar enzimas, en 1982 el comité de *Aditivos y Contaminantes de los Alimentos pertenecientes al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de Inglaterra (ACAMAP)*, publicó un informe donde clasificaba a las enzimas en cinco grupos basados en la conveniencia para utilizarlas en la industria alimentaria, estos cinco grupos se ilustran en el cuadro siguiente:

*Clasificación hecha por ACAMAP para las enzimas según su riesgo de aplicación en la industria alimentaria*

Grupo A	Sustancias en que la evidencia disponible sugiere que son aceptables para su uso en la alimentación.
Grupo B	Sustancias que la evidencia disponible permite considerarlas como provisionalmente aceptables para su uso en la alimentación.
Grupo C	Sustancias para las que la evidencia disponible sugiere un carácter tóxico y cuyo uso en la alimentación no debe ser permitido hasta que pueda aportarse una prueba convincente de su seguridad.
Grupo D	Sustancias para las que la evidencia disponible indica una toxicidad probable o definitiva y cuyo uso en la alimentación debe ser prohibido.
Grupo E	Sustancias para las que no se dispone de datos confiables sobre su toxicología, por lo que no es posible emitir una opinión sobre su aceptación en la Industria alimentaria.

(Tomado de P. Gacesa y J. Hubble 1990)

En un intento de ajustarse a la reglamentación legislativa algunas asociaciones industriales han elaborado sus propias normas. En el caso de la enzimas destinadas a la alimentación, la asociación de fabricantes de Enzimas Vegetales y Animales para la alimentación de animales y plantas (AMFEP) ha establecido las pruebas prioritarias para las materias primas utilizadas en la industria alimentaria las cuales, están contenidas en la tabla 1.1.

**Tabla 1.1 Pruebas de seguridad basadas en la clasificación de la AMFEP para las enzimas utilizadas en alimentación**

Grupo Pruebas (X = a realizarse)	A. Microorganismos que han sido utilizados tradicionalmente en alimentación.	B. Microorganismos presentes en alimentos, que son aceptados como contaminantes inocuos.	C. Microorganismos que no están incluidos en A o B
Patología	Normalmente no requieren ninguna prueba		X
Toxicidad oral aguda, ratón y rata de cuatro semanas		X X	X X
Toxicidad oral durante tres meses, rata		X	X
Mutagénesis in vitro		X	X
Efecto teratógeno, rata Mutagénesis In vivo, ratón			(X)* (X)*
Estudios de toxicidad en el producto final			(X)*
Carconogénesis, rata Fertilidad y reproducción			(X)* (X)*

\* Para realizarse solamente en condiciones excepcionales.  
(Recogido de Reichelt, 1983)

Además de los cinco grupos anteriores en el Reino Unido los aspectos legislativos en cuestión enzimática están cubiertos por el Acta 1974 para la higiene y la seguridad en el trabajo. Exceptuando las referencias ya mencionadas, actualmente no hay ningún otro país donde existan legislaciones para el uso de enzimas y México no es la excepción, ya que en nuestro país no existen reglamentos ni normas que legislen el uso de las enzimas. (38)

#### **2.1.4. DESARROLLO DE LA INDUSTRIA ENZIMÁTICA**

De alguna manera la expansión de la industria enzimática refleja el desarrollo de nuestros conocimientos científicos sobre las enzimas. El conocimiento de la tecnología enzimática se remonta a Christian Hansen, que en 1874 comercializó la primera preparación enzimática normalizada (cuajo), para una aplicación tecnológica (fabricación de queso). Desarrollos posteriores incluyen la concesión, en 1894, de una patente de E.E.U.U. protegiendo la utilización de enzimas diastásicas, y la de otra en 1907, para el uso de proteasas pancreáticas en curtido de cueros. A estas le siguieron las patentes para enzimas proteolíticas, utilizadas en las pruebas de enfriamiento durante la fabricación de cerveza (1911), y enzimas bacterianas aplicadas al blanqueado de textiles (1917). En la tabla 1.2 se resume la situación de producción de enzimas hasta 1977.

Tabla 1.2. Preparaciones enzimáticas comercialmente importantes

Fuente	Nombre	Disponible comercialmente antes de			Producción mundial toneladas de proteína enzimática por año
		1900	1950	1976	
Animal	Cuaajo	X			2
	Tripsina		X		15
	Pepsina		X		5
Vegetal	Amilasa de la malta	X			10.000
	Papaína		X		100
Microbiana	Koji	X			?
	Proteasa de Bacillus		X		500
	Amilglucosidasa			X	300
	Amilasa de Bacillus		X		300
	Glucosa isomerasa			X	50
	Cuaajo microbiano			X	10
	Amilasa fúngica	X			10
	Pectinasa		X		10
	Proteasa fúngica	X			< 10

(Tomado de Aunstrup, 1977)

A partir de 1970, la tecnología enzimática comenzaba a entrar en un periodo de desarrollo industrial, dirigido a la producción de aminoácidos y azúcares a partir de glucososa-isomerizada. En aquel momento, el mercado Europeo y Americano dominaban la comercialización de enzimas (figura 1.1). Dominio que aumentó y se prolongó hasta los ochentas y noventas. Se puede esperar en el futuro que el mercado experimentará un aumento, cuando las enzimas comiencen a utilizarse en mayor grado en procesos de producción de la industria alimentaria. (8,46)

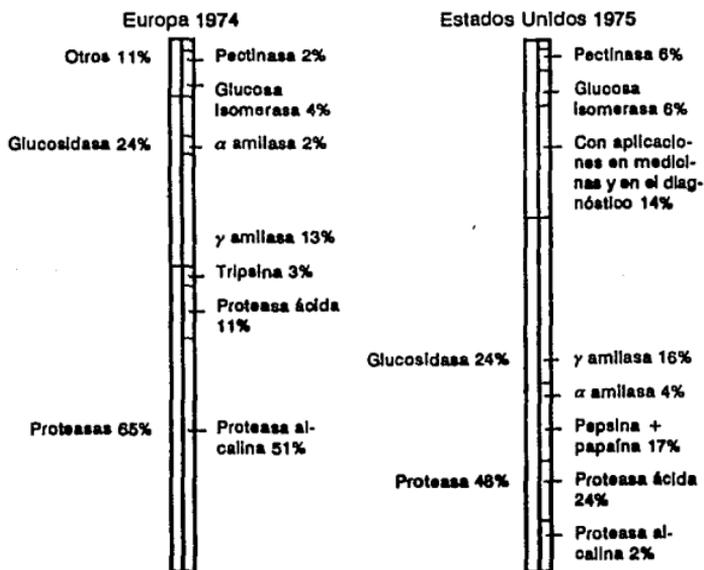


Figura 1.1. Distribución de las ventas de enzimas en Europa y Estados Unidos durante 1975

(Tomado de Solomon, 1977.)

### 2.1.5. IMPORTANCIA DE LA TECNOLOGÍA ENZIMÁTICA

La tecnología enzimática tiene un gran potencial de aplicación en muchos aspectos importantes de la ciencia, que se ilustra en el siguiente cuadro:

<b>Agricultura</b>	Fijación del nitrógeno y biodegradación.
<b>Ingeniería química</b>	Síntesis química y petroquímica.
<b>Industria de los energéticos</b>	Conversión de celulosa.
<b>Utilización en alimentos</b>	Modificaciones deseables.
<b>Industria farmacéutica</b>	Síntesis de antibióticos y para enzimoterapia.

En general, las enzimas tienen una amplia gama de utilización en diversas áreas, y esta gama podría ampliarse en gran forma a medida que las necesidades y el interés de usar biocatalizadores aumente. (8)

## 2.2 UNIDAD II

### PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS

#### INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas. Se encuentran entre las más notables de las biomoléculas conocidas debido a su extraordinaria especificidad y a su poder catalítico. En la actualidad, se han identificado cerca de 2,000 enzimas diferentes. Muchas de ellas se han aislado en forma pura y homogénea y alrededor de unas 200 se han podido cristalizar. Aunque de han identificado la mayor parte de las enzimas relacionadas con el metabolismo básico de la célula, queda por resolver muchos problemas importantes, entre ellos, el control genético de la síntesis enzimática, el papel de algunas enzimas en el desarrollo y la diferenciación, etcétera, Pero sobre todo, todavía no se conoce en términos moleculares, como catalizan las enzimas las reacciones químicas con tal eficiencia, precisión y especificidad (26).

En esta unidad no se hará ningún intento por catalogar y describir el gran número de enzimas, se examinará más bien las propiedades y las características comunes a la mayor parte de las enzimas.

#### 2.2.1. NATURALEZA PROTEICA DE CASI TODAS LAS ENZIMAS

Como se mencionó en la introducción de esta unidad, las enzimas son proteínas que catalizan reacciones biológicas. Esta creencia de que todas las enzimas son de naturaleza proteica, se tuvo hasta el año 1982, cuando el científico

THOMAS CECH encontró que el precursor de un RNA ribosómico de *TETRAHYMENA* ( un protozoo ciliado ) controla su auto-ensamblaje. El intrón de esta molécula de RNA precursora es precisamente eliminado por la actividad catalítica del propio RNA. Este intrón liberado pierde entonces una corta secuencia 5'-terminal, para formar una molécula de RNA de 395 nucleótidos que cataliza la transformación de las OTRAS moléculas de RNA. Este RNA derivado de un intrón cataliza la escisión y el ensamblaje de cadenas de RNA en puntos específicos, sin consumirse el mismo. Así pues es una verdadera ENZIMA. A las proteínas catalizadoras, conocidas hace un siglo, hay que incluir ahora los RNA catalizadores, mejor conocidos como RIBOZIMAS (47). Debido a este descubrimiento de CECH hoy día no es válido decir que todas las enzimas son proteínas. Sin embargo, para los fines que este P.T. persigue nos centraremos en el estudio de las enzimas de naturaleza proteica.

#### **ENZIMAS DE NATURALEZA PROTEICA**

Dado que hemos decidido considerar a todas las enzimas como proteínas esto implica que cualquier agente capaz de lesionar la estructura de la proteína nativa originará, también, la pérdida de la actividad catalítica. Así, la calefacción de las enzimas o la exposición a los agentes desnaturalizantes destruye su actividad catalítica.

Las enzimas poseen pesos moleculares que se hayan comprendidos entre 12,000 y un millón. Algunas enzimas están constituidas solamente, por una o más cadenas polipeptídicas, pero otras contienen, además, algún otro componente químico, que es necesario para la actividad, y que se denomina cofactor. Puede ser este un metal, tal como Mg, Mn, Zn o Fe, o una molécula orgánica compleja, llamada habitualmente coenzima. Algunas enzimas precisan del concurso de ambos; es decir, de un ion metálico y de una

coenzima. Con frecuencia el cofactor se haya unido íntimamente a la porción proteica de la enzima, en cuyo caso recibe, generalmente, el nombre de grupo prostético. Los cofactores son estables, en general, frente al calor, mientras que la porción proteica de la enzima es lábil respecto a la temperatura. (26)

## **2.2.2. ESPECIFICIDAD, CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA**

### **ESPECIFICIDAD**

Uno de los atributos más sobresalientes de las enzimas es la de su especificidad de actuación, de suerte que solo ciertos sustratos experimentan su acción y únicamente tiene lugar un tipo de reacción sin que se produzcan reacciones laterales o subproductos. (26)

Uno de los primeros estudios importantes sobre la especificidad de las enzimas fue efectuado por Emil Fischer, quien descubrió que las enzimas eran capaces de hidrolizar glucósidos, y podían distinguir entre formas estereoisómeras de estos. Esta observación condujo en 1894, a enunciar el principio de que la molécula del sustrato se adapta al centro activo de la enzima del mismo modo que lo haría una llave y una cerradura, es decir que tienen una relación complementaria.

Aunque las enzimas, en comparación con los catalizadores manufacturados, son muy específicas, su grado de especificidad puede en general ser muy variado. Algunas poseen una especificidad casi absoluta respecto a un sustrato determinado, y no atacan a moléculas aunque estén muy relacionadas, mientras que otras enzimas atacan a toda una clase de moléculas con un común denominador estructural, aunque lo hagan a velocidades diferentes. La aspartasa constituye un ejemplo de enzima con especificidad casi absoluta

ya que solo actúa sobre el L-Aspartato y no lo hace sobre el D-Aspartato. Por otro lado tenemos que el grupo de las enzimas de especificidad relativa como lo son: la fosfatasa alcalina, que hidroliza a muchos ésteres diferentes del ácido fosfórico, la carboxiesterasa, que hidroliza ésteres de diversos ácidos carboxílicos y algunas otras. (26)

Como resumen podemos decir que las enzimas de acuerdo a su especificidad se clasifican en:

- a) De especificidad absoluta (atacan un solo sustrato).
- b) De especificidad relativa (atacan un grupo de sustratos).

#### **CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA**

Muchas enzimas han sido designadas añadiendo el sufijo "asa" al nombre del sustrato, es decir, de la molécula sobre la cual la enzima ejerce su actividad catalítica. Por ejemplo, la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea con producción de amoníaco y CO<sub>2</sub>. Esta nomenclatura, sin embargo, no siempre ha resultado práctica, lo cual ha ocasionado que muchas enzimas reciban nombres que químicamente informan poco (p.e. pepsina, tripsina, catalasa). Por dicha razón, y porque el número de enzimas que se descubren esta aumentando rápidamente, la UIB (Unión Internacional de Bioquímica), recomendó un sistema de nomenclatura que consiste en dividir a las enzimas en seis clases principales, cada una de las cuales, se divide a la vez en subclases, de acuerdo con el tipo de reacción que es catalizada. Cada enzima se designa por un nombre recomendado generalmente corto; por un nombre sistemático, que identifica la reacción que cataliza, y por un número de clasificación, que se emplea cuando se precisa la identificación inequívoca de la enzima. A continuación se enlistaran las seis clases que la UIB recomienda para la nomenclatura de enzimas:

1. Oxido-Reductasas (Reacciones de Oxido Reducción)
2. Transferasas (Transferencia de grupos funcionales)
3. Hidrolasas (Reacciones de hidrólisis)
4. Liasas (Adición a dobles enlaces)
5. Isomerasas (Reacciones de isomerización)
6. Ligasas (Formación de enlaces con escisión de ATP)

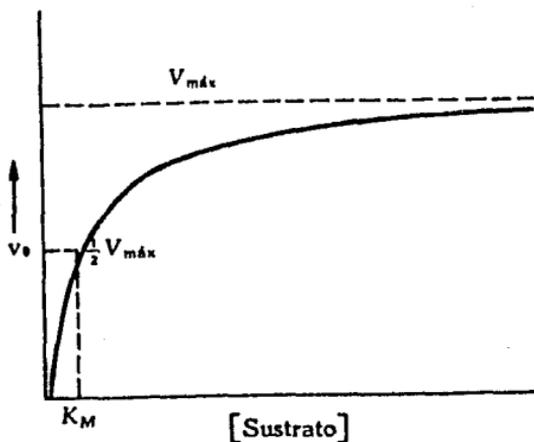
Con la finalidad de hacer más claro el mecanismo de nombrar a las enzimas se mostrará un ejemplo. Se da la enzima que cataliza la reacción:



El nombre recomendado de esta enzima, es *creatinquinasa* y el nombre sistemático, que se basa en la reacción catalizada, es *ATP: creatin-fosfotransferasa*. Su número de clasificación es EC. 2.7.3.2, en donde, EC significa, abreviadamente, Comisión de Enzimas; la primera cifra (2) representa el nombre de la clase (transferasa), la segunda cifra (7) representa la subclase (fosfotransferasa), la tercera cifra la subclase (fostransferasas con un grupo nitrógeno como aceptor) y la cuarta cifra (2) designa la creatin cinasa. (26)

### 2.2.3. CINÉTICA ENZIMÁTICA

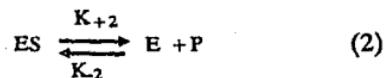
Los principios generales de la cinética de las reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por las enzimas, pero estas muestran también un rasgo característico que no se observa en las reacciones no enzimáticas: la saturación con el sustrato. En la figura 2.1 vemos el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de la reacción catalizada por una enzima.



*Figura 2.1*  
Efecto de la concentración del sustrato  
sobre la velocidad de una reacción  
catalizada enzimáticamente. (27)

En 1913 L. Michaelis y M. L. Menten, desarrollaron una teoría general acerca de la acción y cinética de las enzimas. Esta teoría, es fundamental en el análisis cuantitativo de todos los aspectos de la cinética e inhibición de enzimas. A continuación se muestra la deducción de la ecuación de Michaelis-Menten.

La teoría de Michaelis-Menten supone que la enzima E se combina con el sustrato S para formar el complejo enzima sustrato ES; a continuación este último se escinde en una segunda etapa, para formar enzima libre y producto P.



Estas reacciones son reversibles; las constantes de velocidad para las reacciones directa e inversa, poseen un subíndice positivo y otro negativo, respectivamente.

El objeto de esta deducción es definir una expresión general para  $V_0$  que es la velocidad inicial de una reacción catalizada enzimáticamente.

La velocidad inicial es igual a la velocidad de ruptura del complejo enzima sustrato ES de acuerdo con la ecuación (2); podemos escribir para ella la ecuación de velocidad de primer orden:

$$V_0 = K_{+2} [ES] \quad (3)$$

Sin embargo, ya que ni  $K_{+2}$  ni  $[ES]$ , pueden determinarse directamente, debemos encontrar otra expresión para  $V_0$  en función de otras variables que puedan medirse con más facilidad. Para ello escribiremos en primer lugar la ecuación de velocidad de segundo orden para la formación de ES a partir de E y de S:

$$d[ES]/dt = K_{+1}([ET] - [ES]) [S] \quad (4)$$

A continuación escribiremos la ecuación de velocidad para la descomposición de ES.

$$-d[ES]/dt = K_{-1} [ES] + K_{+2}[ES] \quad (5)$$

Cuando la velocidad de formación de ES es igual a su velocidad de desaparición, es decir, cuando el sistema ha alcanzado el *estado estacionario*, que se define como aquél en que la concentración de ES permanece constante, entonces:

$$K_{+1}([ET] - [ES]) [S] = K_{-1}[ES] + K_{+2}[ES]. \quad (6)$$

Reordenando la ecuación (6) obtenemos:

$$[S]([ET] - [ES])/[ES] = [K_{-1} + K_{+2}/K_{+1}] = K_m. \quad (7)$$

La constante global  $K_m$ , que sustituye al término  $(K_{-1} + K_{+2})/K_{+1}$  se llama constante de *Michaelis-Menten*.

A partir de esta ecuación puede obtenerse la concentración del complejo ES en el estado estacionario, dejando dicho término:

$$[ES] = [ET][S]/(K_m + [S]). \quad (8)$$

Ya hemos visto (anteriormente), que la velocidad inicial de reacción  $V_o$  de una reacción enzimática es:

$$V_o = K_{+2} [ES]. \quad (3)$$

Podemos sustituir, ahora, el término  $[ES]$ , que figura en la ecuación (3), por su valor en la ecuación (8)

$$V_o = (K_{+2}) [ET] [S]/ K_m + [S] \quad (9)$$

Cuando la enzima se halla saturada, se alcanzará la velocidad máxima,  $V_{max}$ , dada por:

$$V_{max} = K_{+2} [ET] \quad (10)$$

En la que  $[ET]$  es la concentración total de la enzima. Sustituyendo  $K_{+2} [ET]$  por su valor deducido en la ecuación (10), así se obtiene:

$$v_o = (v_{max} [S]) / (K_m + [S]) \quad (11)$$

Es la ecuación de Michaelis-Menten, es la *ecuación de la velocidad* para una reacción de un solo sustrato, catalizada enzimáticamente. Relaciona la velocidad inicial, la velocidad máxima y la concentración del sustrato a través de la constante de Michaelis-Menten.

Además de lo mostrado anteriormente, una reacción donde intervienen una enzima es afectada por la temperatura, el pH del medio donde se realiza la reacción, la fuerza iónica y otros factores secundarios. A continuación se discutirá el efecto que tienen los factores anteriormente enunciados en una reacción enzimática.

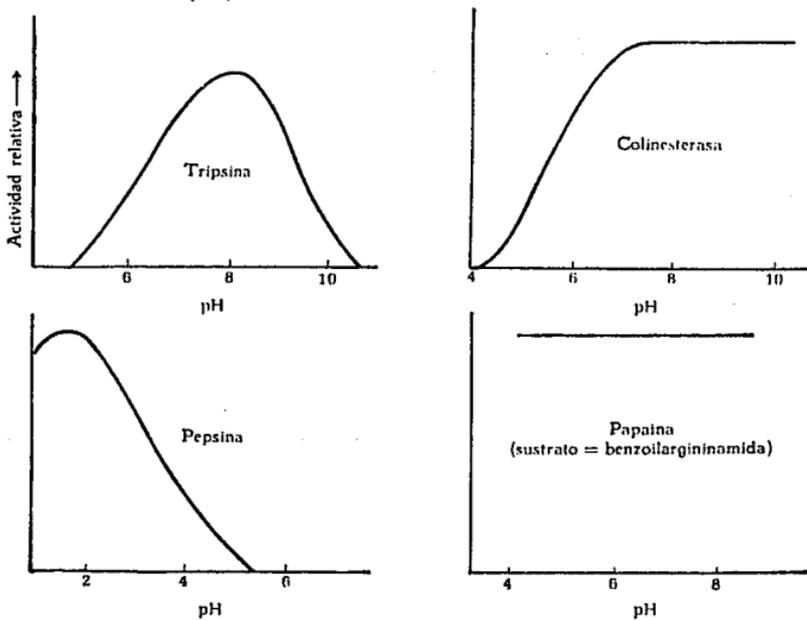
### EFFECTO DEL pH

Las enzimas poseen un pH óptimo característico, al cual su actividad es máxima; por encima, y por debajo de este pH la actividad desciende. El pH óptimo de una enzima no es necesariamente idéntico al pH de su entorno intracelular normal, el cual puede hallarse sobre la pendiente ascendente o descendente de la curva de actividad respecto del pH; de este modo, el pH intracelular puede colaborar a regular la actividad de las enzimas.

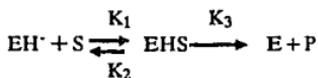
En la figura 2.2 se ilustra gráficamente el comportamiento cinético de las enzimas con respecto al pH. A continuación se deducirá una ecuación matemática que define el pH óptimo de una enzima.

**Figura 2.2**

Curvas de actividad en función del pH de algunos enzimas. (27)

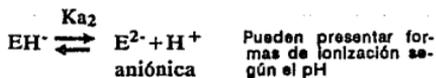
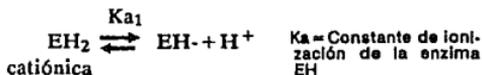


**Deducción de la Ecuación que Define el pH óptimo de una enzima**



$\text{EH}^-$  = Enzima en forma activa con cierto grado de ionización

$\text{EH}$  = Enzima en medio ácido.



Donde:

$$\text{Ka}_1 = \frac{[\text{EH}^-] [\text{H}^+]}{[\text{EH}]}$$

$$\text{Ka}_2 = \frac{[\text{E}^{2-}] [\text{H}^+]}{[\text{EH}^-]}$$

Despejando de  $K_{a1}$  y  $K_{a2}$  a  $EH_2$  y  $E^-$  respectivamente se tiene:

$$E_T = ([EH^-] [H^+]) / (K_{a1} + EH^- + (K_{a2} [EH^-]) / [H^+])$$

$$E_T = EH^- (H^+ / K_{a1} + 1 + K_{a2} / [H^+])$$

despejando  $EH^-$  tenemos:

$$EH^- = (E_T) / (H^+) / (K_{a1} + 1 + (K_{a2}) / [H^+])$$

Donde:

$$V = K_3 EHS$$

$EH_2 =$  pH ácido

$EH =$  pH de trabajo más adecuado reconocimiento del sustrato

$E^- =$  pH más básico

En la saturación tenemos que:

$$V = V_{m\acute{a}x}$$

$$V_{m\acute{a}x} = K_3 EH^-$$

$$V_{m\acute{a}x} = (K_3 E_t) / [H^+ / K_{a1} + 1 + K_{a2} / [H^+]]$$

La velocidad será mayor cuando:

$$H^+/K_{a1} = K_{a2}/H^+$$

$K_{a1} = K_{a2}$  entonces la enzima se encuentra ionizada en forma de mayor actividad:

$$[H^+]^2 = K_{a1} K_{a2}$$

$$2\log [H^+] = \log K_{a1} + \log K_{a2}$$

$$2pH = pK_{a1} + pK_{a2}$$

$$pH \text{ óptimo} = (pK_{a1} + pK_{a2})/2$$

**El pH afecta:**

- La ionización de enzimas y sustrato
- Ionización de los productos: influye en la purificación
- Cambios en las constantes de equilibrio
- Influye en la contaminación microbiana
- Afecta la estabilidad de la enzima afectando a su vez la productividad de la misma.

### EFFECTO DE LA TEMPERATURA

Existen dos factores que deben ser tomados en cuenta en lo que se refiere a las relaciones entre la temperatura y la actividad enzimática. Al elevar la temperatura, por un lado, la actividad enzimática o sea la velocidad inicial presenta un aumento. Por otro lado y simultáneamente se presenta el fenómeno de la desnaturalización térmica de las enzimas, que se desprende de su naturaleza Proteica. Ambos fenómenos, el catalítico y el de desnaturalización pueden ser descritos por modelos matemáticos.

En la figura 2.3 se mostrará gráficamente el comportamiento de las enzimas con respecto a la temperatura.

La ecuación de *Arrhenius* que se muestra a continuación es la que define el comportamiento de una enzima ante la temperatura.

$$K = ae^{\Delta G/RT}$$

Donde:

K = cte de velocidad

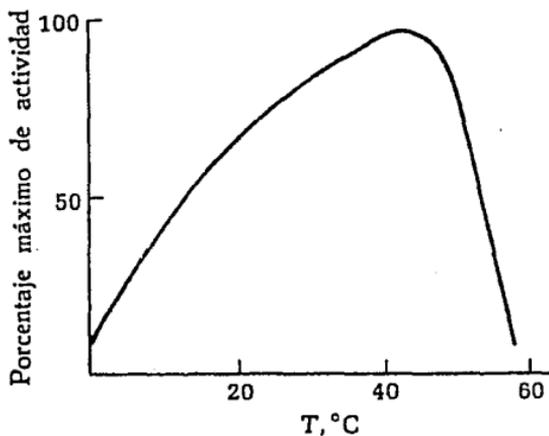
$\Delta G$  = Energía libre de activación

T = Temperatura absoluta

R = cte. de los gases

*Figura 2.3*

*Efecto de la temperatura sobre la actividad de un enzima. Los enzimas varían con respecto a su estabilidad térmica. La porción descendente de la curva se debe a la desnaturalización térmica. (27)*



### FUERZA IÓNICA

La fuerza iónica ( $\mu$ ) también es uno de los factores principales que tienen que ver con la cinética enzimática, ya que es muy importante proporcionar a la enzima valores de fuerza iónica óptimos para ella, con la finalidad de que su actividad sea máxima. En la figura 2.4 se muestra el comportamiento de las enzimas ante la fuerza iónica.

La fuerza iónica a pH constante puede cambiar ya que influye en la ionización de la enzima y el sustrato, de acuerdo con la siguientes ecuaciones:

$$\log K = \log K_0 + Z_A Z_B \mu^{1/2}$$

$$\mu = 1/2 \sum (C_i Z_i^2)$$

Donde:

$K$  = cte. de velocidad

$K_0$  = cte. de velocidad cuando  $\mu = 0$

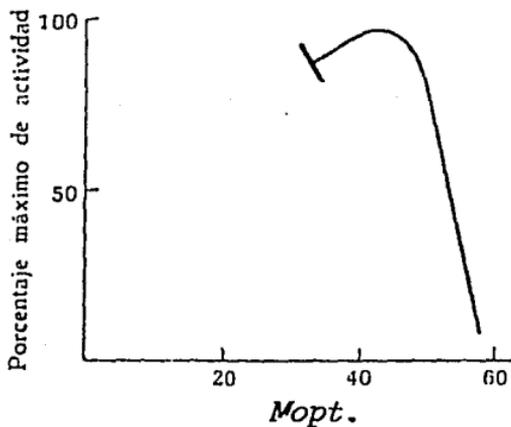
$Z_A$  = carga

$Z_B$  = carga

La fuerza iónica óptima indica cómo afectan las cargas en la enzima y sustrato o en los grupos funcionales de la enzima.

*Figura 2.4*

*Efecto de la fuerza iónica  
sobre la actividad de una enzima (27)*



**TRANSFORMACIONES DE LA ECUACIÓN DE MICHAELIS-MENTEN**

La ecuación de Michaelis-Menten (ec. 11) puede transformarse algebraicamente en otras formas que son más útiles para la expresión de los datos experimentales. Una de las transformaciones más corrientes se obtiene, sencillamente, tomando los recíprocos de ambos miembros de la ecuación de Michaelis-Menten.

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

Reordenando tendremos

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

que se reduce a

$$\boxed{1/V_o = (K_m/V_{m\acute{a}x})(1/[S]) + 1/V_{m\acute{a}x}} \quad (12)$$

La ecuación (12) es la ecuación de *Lineweaver-Burk*. Cuando  $1/V_o$  se representa frente a  $1/[S]$ , se obtiene una línea recta. La pendiente de la recta es  $K_m/V_{m\acute{a}x}$ , y la intersección sobre el eje  $1/V_o$  es  $1/V_{m\acute{a}x}$ ; la intersección sobre el eje  $1/[S]$  es  $-1/K_m$  (figura 2.5a).

Esta representación doble-recíproca tiene la ventaja de que permite la determinación mucho más exacta del valor de  $V_{m\acute{a}x}$ . La representación doble recíproca puede proporcionar también información valiosa acerca de la inhibición enzimática.

Otra transformación útil de la ecuación de Michaelis-Menten se obtiene multiplicando ambos miembros de la ecuación (12) por  $V_{m\acute{a}x}$  y reordenando para dar la ecuación.

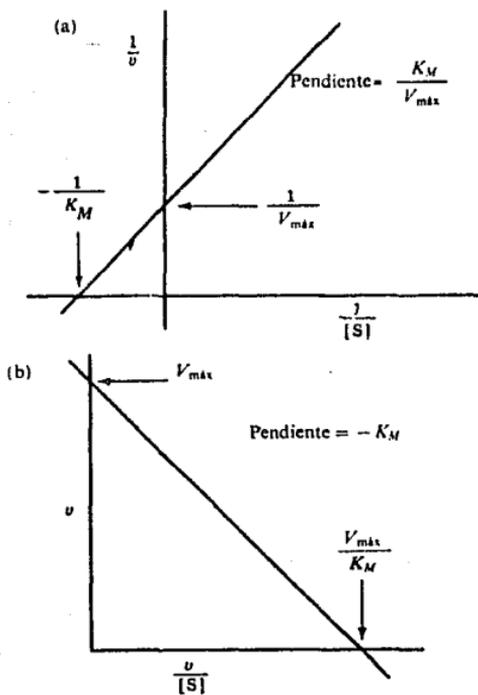
$$V_o = - (K_m)(V_o / [S]) + V_{m\acute{a}x} \quad (13)$$

La representación de  $V_o$  frente a  $V_o/[S]$ , llamada representación de *Eadie-Hofstee* (figura 2.5b), no solamente da los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  y de  $K_m$  en forma muy sencilla, sino que también amplía las desviaciones del carácter lineal que puede no aparecer en una representación doble recíproca. (26)

#### 2.2.4. INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

A partir del estudio de los inhibidores de las enzimas se ha obtenido información de importancia sobre mecanismo y los caminos de la catálisis enzimática, la especificidad de sustrato de las enzimas, la naturaleza de los grupos funcionales en el centro activo y la participación de ciertos grupos funcionales en el mantenimiento de la conformación activa de la molécula de la enzima. Además, la inhibición de algunas enzimas por metabolitos específicos constituye un elemento importante en la regulación del metabolismo intermediario. Una enzima puede presentar inhibición tanto reversible como irreversible.

Los tres tipos principales de inhibición reversible de las enzimas son: *competitiva*, *acompetitiva* y *no competitiva*, de los cuales hablaremos enseguida.



**Figura 2.5** Determinaciones gráficas de los parámetros catalíticos utilizando las formas de línea recta de la ecuación de Michaelis-Menten. (a) Gráfica de Lineweaver-Burk. (b) Gráfica de Eadie-Hofstee. (27)

### INHIBICIÓN COMPETITIVA

La característica de la inhibición competitiva es que el inhibidor puede combinarse con la enzima libre de tal modo que compite en el sustrato normal para unirse al centro activo. Un inhibidor competitivo reacciona reversiblemente con la enzima para formar un complejo enzima-inhibidor (EI) análogo al complejo enzima sustrato:



La molécula del inhibidor no resulta químicamente alterada por la enzima.

La presencia de un inhibidor competitivo incrementa, por tanto, el  $K_m$  aparente de la enzima por el sustrato, es decir, provoca que se precisen concentraciones de sustrato superiores para que se alcance la velocidad máxima. Por otra parte, un inhibidor competitivo se caracteriza por no afectar al valor de  $V_{m\acute{a}x}$ , indicando con ello que no interfiere con la velocidad de ruptura del complejo enzima-sustrato.

El ejemplo clásico de inhibición competitiva lo constituye la inhibición de la succinato-deshidrogenasa por el malonato, y por otros aniones dicarboxilato (Fig. 2.6). (26)

### **INHIBICIÓN ACOMPETITIVA**

En este tipo de inhibición, cuya designación no es muy apropiada, el inhibidor no se combina con la enzima libre ni afecta a su reacción con el sustrato normal; sin embargo, el inhibidor se combina con el complejo enzima-sustrato para formar un complejo inactivo *enzima-sustrato-inhibidor*, el cual, no experimenta su transformación posterior en el producto habitual de la reacción.



Estas relaciones demuestran que el grado de inhibición puede aumentar cuando la concentración de sustrato se ve aumentada. La inhibición acompetitiva es poco frecuente en las reacciones de un solo sustrato, pero es corriente en las reacciones de dos sustratos (Fig. 2.6). (4)

### **INHIBICIÓN NO COMPETITIVA**

Un inhibidor no competitivo puede combinarse con la enzima libre o bien con el complejo enzima-sustrato, interfiriendo con la acción de ambos. Los inhibidores no competitivos se unen a un centro de la enzima distinto del centro o sitio activo, a menudo para deformar a la enzima, de modo que no pueda formarse el complejo ES a su velocidad normal y que una vez formado no se descomponga a su velocidad habitual para liberar los productos de reacción. Sus efectos no se anulan al aumentar la concentración del sustrato. En la inhibición no competitiva la reacción con el inhibidor produce dos formas inactivas EI y ESI:



El tipo más corriente de inhibición no competitiva es producida por los reactivos que pueden combinarse reversiblemente con algún grupo funcional de la enzima (situado fuera del sitio activo), que sea esencial para mantener la conformación tridimensional catalíticamente activa de la molécula de la enzima. Algunas enzimas (aunque no todas ellas) que poseen un grupo -SH esencial, son inhibidos no competitivamente por los iones de metales pesados, sugiriendo que tales grupos -SH deben permanecer intactos para que la enzima conserve su conformación activa normal.

Algunas enzimas que precisan de iones metálicos para su actividad son inhibidos no competitivamente por agentes capaces de unirse al metal esencial. Por ejemplo, el quelante tetra-acétato de etilendiamino (EDTA), se une reversiblemente al  $Mg^{+}$  y otros cationes divalentes, inhibiéndose así de modo no competitivo a algunas enzimas que precisan de tales iones para su actividad (Fig. 2.6). (26)

### **INHIBICIÓN IRREVERSIBLE: MODIFICACIÓN DE LA ENZIMA**

En la inhibición reversible de las enzimas, discutida anteriormente, el inhibidor interviene en un equilibrio fácilmente reversible, que se establece con rapidez, con la enzima o con el complejo enzima-sustrato, y que puede analizarse mediante la ecuación de Michaelis-Menten. Sin embargo, algunas enzimas experimentan inactivación irreversible cuando se tratan con agentes capaces de unirse covalentemente y que modifican de modo permanente a un grupo funcional, necesario para la catálisis con lo que se inactiva la

molécula de la enzima. Este tipo de inhibición no puede ser tratado por los mecanismos de Michaelis-Menten, que supone la formación reversible de los complejos EI o ESI. Con frecuencia, la inhibición reversible se manifiesta lentamente en comparación con la cinética de la reacción normal de la enzima, de modo que al principio la inhibición es incompleta, pero aumenta continuamente con el tiempo debido a que se produce la modificación de una fracción creciente de las moléculas de la enzima. (26)

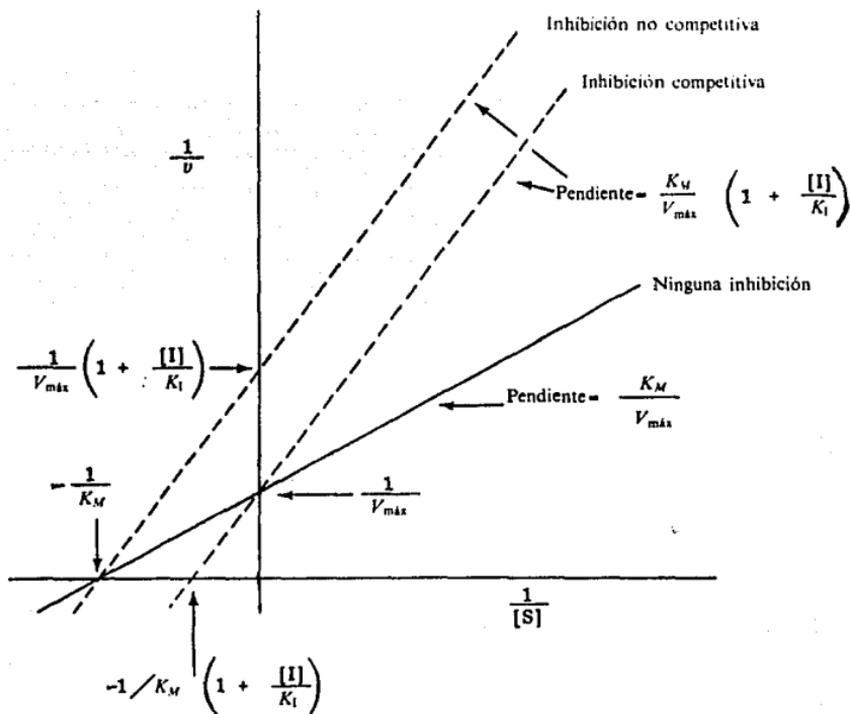


Figura 2.6 Efectos de inhibición competitiva y no competitiva sobre la gráfica de Lineweaver-Burk de una reacción catalizada por una enzima. (27)

### 2.2.5. BIOSÍNTESIS DE ENZIMAS (EXPRESIÓN GENÉTICA) Y MECANISMOS DE REGULACIÓN

El mecanismo de la biosíntesis de las enzimas y en general de las proteínas, por su gran diversidad de actividades biológicas y por su especificidad de especie, ha sido uno de los mayores retos de la historia de la Bioquímica. Durante muchos años, no pudieron ser contestadas cuestiones tan sencillas sobre la síntesis proteica tales como: ¿Se constituyen las proteínas residuo a residuo o bien por ensamblaje de muchos péptidos cortos prefabricados? ¿Se sintetizan todas las proteínas celulares a partir de un largo polipéptido precursor y posteriormente se producen alteraciones específicas en sus grupos R? En realidad, hasta los comienzos de la década de 1950, no se supo con seguridad que las proteínas eran compuestos químicos específicos, de peso molecular, composición aminoácida y secuencia definida aunque en la actualidad se dispone de una gran información sobre el proceso global de la síntesis de enzimas, es innegable, que todo este proceso empezó a entenderse con mayor claridad desde que el científico Crick desarrolló el *dogma central* de la genética molecular, que establece que la información genética fluye del DNA al RNA y de este a la enzima (proteína).



El dogma central define tres procesos principales de la preservación y transmisión de la información genética. El primero de ellos, es el de la *replicación* o copia de DNA para formar moléculas hijas idénticas. El segundo es la *transcripción*, proceso mediante el cual, el mensaje genético del DNA es transcrito en forma de RNA mensajero para ser

llevado a los ribosomas. El tercero es la *traducción*, proceso por el cual el mensaje genético es < descifrado > en los ribosomas. El dogma central resulto apoyado no solo por el descubrimiento del RNA mensajero sino también por la demostración de que la secuencia de nucleótidos de un gen guarda una correspondencia lineal con la secuencia de aminoácidos de la enzima (proteína) codificada por dicho gen. A demás se ha deducido el "*diccionario*" de los vocablos del código de los tripletes en el RNA mensajero o sea el CÓDIGO GENÉTICO (figura 2.7), lo cual ha constituido una de las mayores conquistas de la ciencia moderna. (26)

Con la finalidad de no hacer muy extensa la explicación de los mecanismos tanto de regulación como de biosíntesis de enzimas y aprovechando que éstos ya fueron revisados con detalle en la materia de bioquímica, en este manual sólo nos concretaremos a presentar dos esquemas que serán útiles para recordarnos como se llevan a cabo los mencionados procesos. Estos esquemas son la figura 2.8 que explica el *mecanismo de regulación* con el conocido ejemplo de *operón lac* y la figura 2.9 que ilustra el proceso de *transcripción* de la información genética.

		Second position				
		U	C	A	G	
First position (5' end)	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U
		UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	C
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA } Stop	UGA } Stop	A
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG } Stop	UGG } Trp	G
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U
		CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C
		CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A
		CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G
	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U
		AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	C
		AUA } Met	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	A
		AUG } Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg	G
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U
		GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	C
		GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A
		GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G

Figura 2.7

El Código Genético (47)

U = uracilo

C = citosina

A = adenina

G = guanina

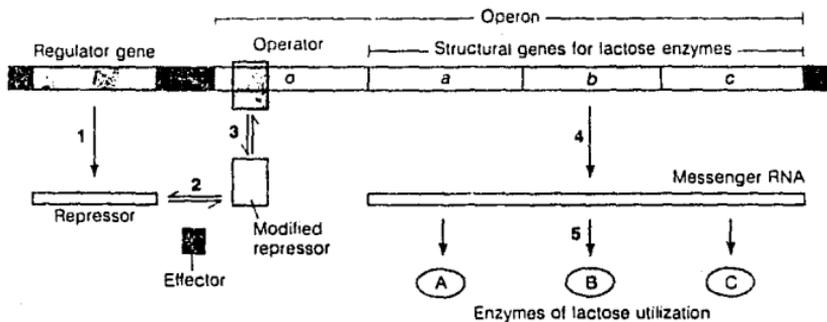


Figura 2.8  
Operón Lac (41)

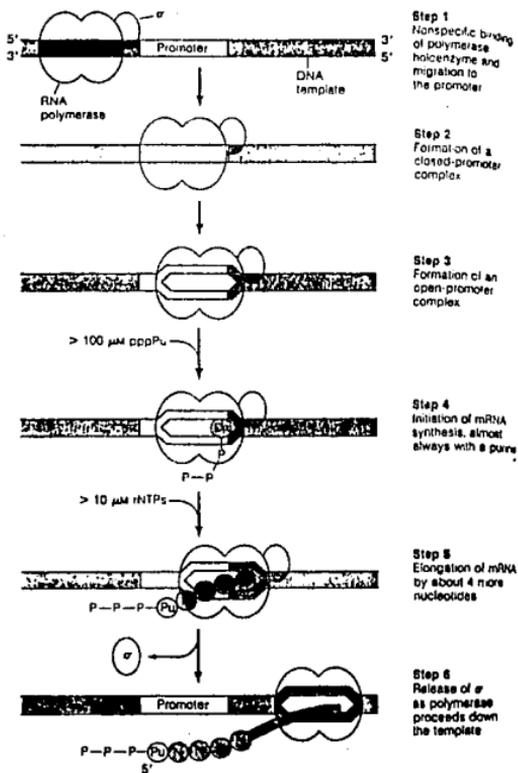


Figura 2.9  
Pasos en la iniciación y  
elongación, en el proceso  
de transcripción, de la  
información genética. (41)

## **ETAPAS EN LA SÍNTESIS DE ENZIMAS (PROTEÍNAS)**

Hoy en día, se sabe que existen cinco etapas principales en la síntesis de las enzimas (proteínas), cada una de las cuales precisan de varios componentes. En seguida se describen, de modo resumido, las distintas etapas:

### **Etapas 1: Activación de los Aminoácidos**

En esta etapa ( figura 2.10 ), que tiene lugar en el citosol y no en el ribosoma cada uno de los 20 aminoácidos se une covalentemente a un RNA de transferencia específica, a expensas de la energía del ATP. Estas reacciones son catalizadas por un grupo de enzimas activadoras, dependientes de  $Mg^{+}$ , cada uno de los cuales, es muy específico, tanto para el aminoácido como para el t RNA correspondiente.

### **Etapas 2: Iniciación de la Cadena Polipeptídica**

Enseguida, el RNA mensajero portador del código (figura 2.11) que especifica al polipéptido que se va a sintetizar, se enlaza a la subunidad menor del ribosoma y, a continuación, lo hace el aminoácido iniciador unido a su t RNA, para formar un complejo de iniciación. El t RNA del aminoácido iniciador se aparea con un triplete nucleotídico o códon específico presente en el m RNA, que señala el comienzo de la cadena polipeptídica. Este proceso, que precisa de trifosfato de guanósina (GTP), se promueve por tres proteínas citosólicas específicas, denominadas factores de iniciación.

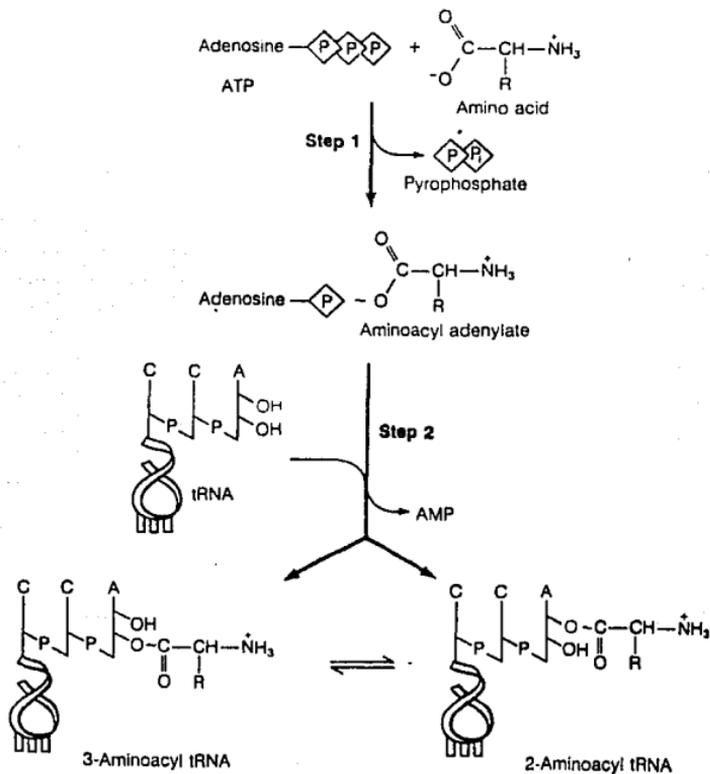
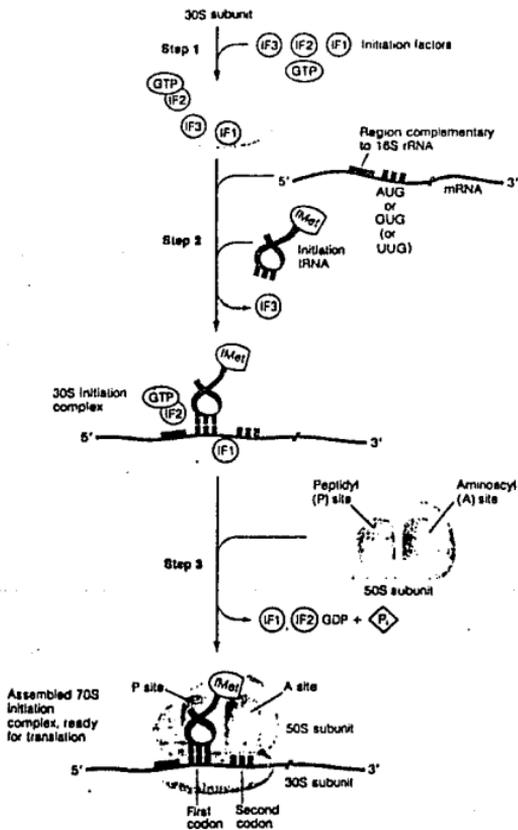


Figura 2.10 Activación de los aminoácidos. (41)

**DESARROLLO DE LOS FUNDAMENTOS BÁSICOS DEL CURSO TEÓRICO**



**Figura 2.11**  
**Iniciación de la biosíntesis**  
**de una enzima (41)**

### **Etapa 3: Elongación**

Después se prolonga la cadena polipeptídica ( figura 2.12) por unión covalente de sucesivos restos aminoácilo, cada uno de los cuales, es transportado al ribosoma y colocado en posición adecuada por su correspondiente t RNA, el cual, aparea sus bases respondiendo a un codón específico del m RNA. Para la prolongación son indispensables unas proteínas citosólicas llamadas factores de prolongación. La energía necesaria para la unión de cada aminoacil-t RNA entrante y para el desplazamiento codón a codón, del ribosoma a lo largo del RNA mensajero, la suministra la hidrólisis de dos moléculas de GTP por cada residuo adicional al polipéptido en crecimiento.

### **Etapa 4: Terminación y Liberación**

Después de la terminación de la cadena polipeptídica (figura 2.13), que está señalizada por un codón de terminación en el m RNA, se produce su liberación del ribosoma, con el concurso de los factores de liberación. (26)

### **Etapa 5: Plegamiento y Transformación**

La forma nativa, biológicamente, del polipéptido se consigue después que éste experimenta un plegamiento que le permite adoptar la conformación tridimensional adecuada (figura 2.14). Antes o después del plegamiento, el polipéptido sintetizado puede experimentar una transformación por acción enzimática con objeto de eliminar el aminoácido iniciador, introducir grupos fosfato, metilo, carboxilo u otros en determinados restos aminoácidos, o bien para unir oligosacáridos o grupos prostéticos.

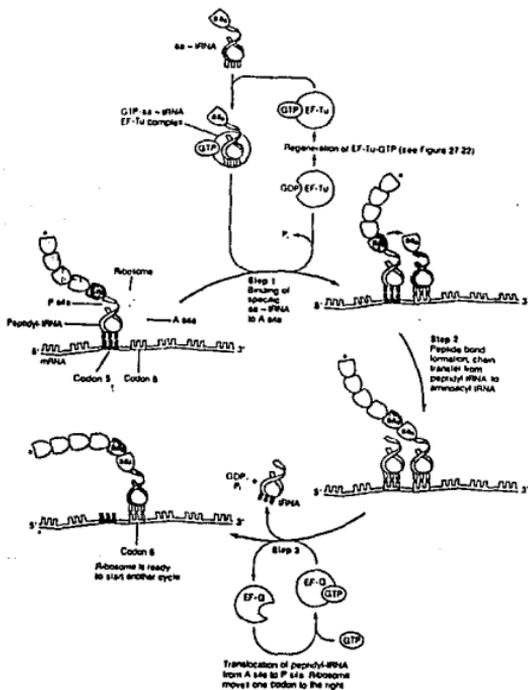


Figura 2.12 Etapa de Elongación (41)

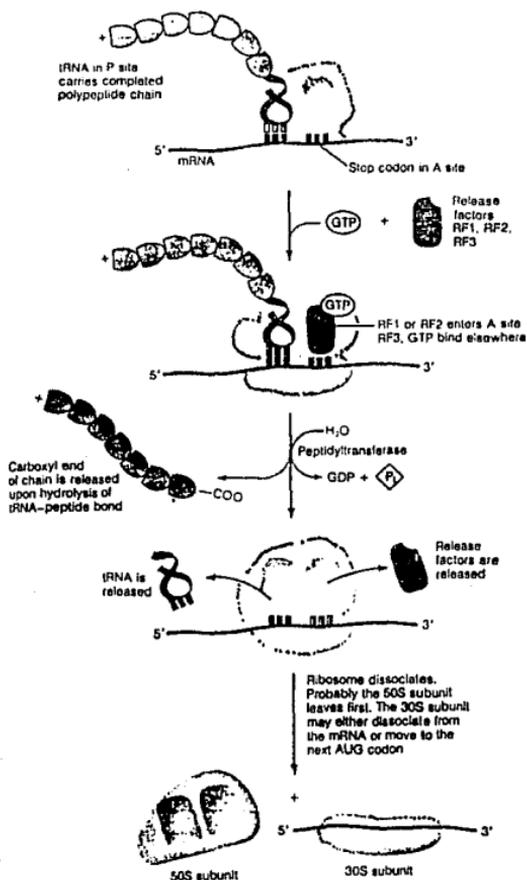
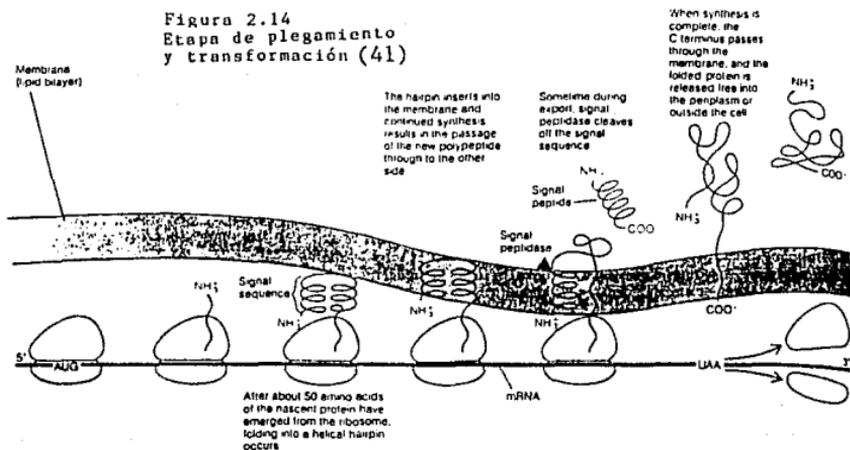


Figura 2.13  
Etapa de terminación(41)

Figura 2.14  
Etapa de plegamiento  
y transformación (4)



La tabla 2.1 resume los componentes necesarios para cada una de las cinco etapas.

**Tabla 2.1. Componentes necesarios en las cinco etapas principales de la síntesis de polipéptidos**

<b>Etapas</b>	<b>Componentes necesarios</b>
1. Activación de los aminoácidos	20 aminoácidos 20 aminoacil-tRNA sintetasas 20 o más RNAs de transferencia ATP Mg <sup>+</sup>
2. Iniciación de la cadena polipéptida	RNA mensajero N-formilmetionil-tRNA Codón de iniciación en el mRNA Subunidad ribosomal 30S Subunidad ribosomal 50S GTP Mg <sup>+</sup> Factores de iniciación (IF-1, IF-2, IF-3)
3. Elongación	Ribosomas 70S funcional Aminoacil-tRNAs especificados por codones Mg <sup>+</sup> Factores de prolongación (Tu, Ts, G) GTP Peptidil transferasa
4. Terminación	ATP Codón de terminación Factores de liberación del polipéptido (R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> y S)
5. Plegamiento y transformación	Enzimas y cofactores específicos necesarios para la eliminación de los residuos iniciadores

(Tomado de Lehninger 1989)

## 2.3 UNIDAD III

### PROCEDENCIA COMERCIAL DE LAS ENZIMAS EMPLEADAS EN ALIMENTOS

La mayoría de las enzimas que son comercialmente importantes se producen a partir de un número limitado de microorganismos. Las especies más útiles al respecto se han establecido, sobre todo, a partir de las ya conocidas; éstas suelen ser las que se emplean en la industria alimentaria.

Tradicionalmente se han obtenido pocas enzimas de origen animal (lipasa pancreática y tripsina) debido a que éstas pueden ser remplazadas por otras similares, derivadas de microorganismos. Sin embargo, los sustitutos microbianos, aunque catalíticamente eficaces, presentan sutiles diferencias en sus propiedades que pueden ser cruciales en el proceso de su aplicación.

Las plantas también han sido fuente tradicional de un cierto número de enzimas. A partir del látex producido por la papaya, higuera, piña y en menor grado por otras especies, se ha aislado, sobre todo, cistein-proteinasas. Estas plantas tienen la ventaja de que su látex es fácil de obtener, principalmente, a partir de los frutos y utilizando mano de obra no calificada.

El empleo de enzimas de origen vegetal y animal va decayendo en el mercado con respecto a la totalidad; las razones difieren en cada caso. Las plantas productoras de enzimas crecen mejor en regiones tropicales o subtropicales generalmente países del tercer mundo, donde una infraestructura escasamente organizada y, además, la inherente

inestabilidad política y económica, son una gran limitante para la obtención de enzimas de origen vegetal. Por el contrario, los problemas económicos que presentan las enzimas de origen animal son otros. Estas enzimas derivan, generalmente de materiales de desecho a menudo de la industria cárnica, por lo que la materia prima para la obtención de enzimas tiene precios que son fijados por factores externos a la industria. Todo ello, aunado a los problemas propios derivados del empleo de animales con fines diferentes al de la alimentación, constituyen las limitaciones más sobresalientes que pesan sobre este tipo de fuente comercial de enzimas. Por todo lo anteriormente dicho, la fuente de obtención de enzimas con más ventajas y mejores resultados es el obtenerlas de fuentes microbianas, generalmente, en todos los casos. (8,15)

### **2.3.1. ENZIMAS MICROBIANAS**

Los microorganismos producen una enorme gama de enzimas potencialmente útiles, muchas de las cuales son segregadas al exterior celular. Por otra parte, son capaces de desarrollarse fácil y rápidamente en su medio de cultivo y la tecnología al respecto, a gran escala, se encuentra hoy bien establecida.

Las enzimas extracelulares poseen tres ventajas. *Primera:* dado que la molécula es segregada fuera de la célula, no se requieren técnicas de ruptura celular, técnicas que a veces son difíciles de aplicar a gran escala; *Segunda:* el número de proteínas que se segregan es limitado y por eso es relativamente fácil aislar una enzima concreta a partir de la mezcla. Contrariamente a todo ello, las enzimas intracelulares se han de separar a partir de una mezcla amplia de sustancias, que incluyen otras proteínas y materiales contaminantes, tales como ácidos nucleicos por ejemplo; *Tercera:* Las enzimas extracelulares suelen presentar una estructura más compacta y son menos susceptibles a la desnaturalización que las correspondientes intracelulares.

Convencionalmente se define a las enzimas extracelulares, como aquéllas que han cruzado la membrana celular. Es importante establecer este concepto, porque los microorganismos, poseen una variedad de estructura del tipo de la pared celular, y en muchos casos, la enzima extracelular se encuentra asociada a ella y no liberada al medio de cultivo. (8,15)

### **2.3.2. CONTROL DE LA PRODUCCIÓN MICROBIANA DE ENZIMAS**

La optimización de la producción de enzimas a partir de microorganismos depende de una serie de factores interrelacionados. Ello significa, en términos prácticos, que una enzima solo puede sintetizarse durante parte del ciclo de crecimiento. Por ejemplo, algunas proteínas son sintetizadas y segregadas durante la fase de crecimiento activo (exponencial) del organismo, mientras que otras no aparecen hasta la fase estacionaria.

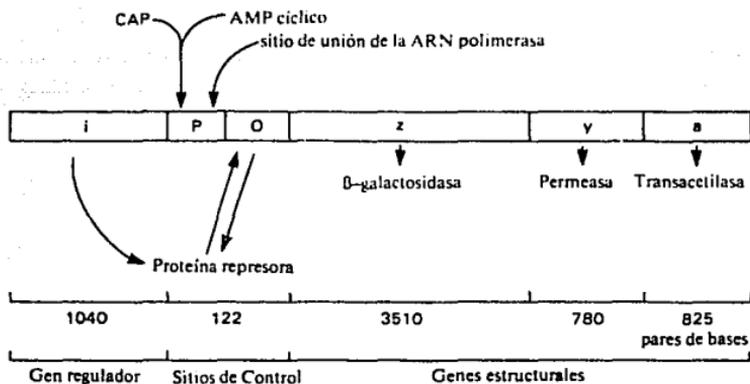
Para comprender la causa de la variabilidad existente con respecto al momento de inicio y a la magnitud de la síntesis de una enzima, es necesario conocer algunos aspectos del control genético de la producción enzimática. Escencialmente, existen dos clases identificables de enzimas. El primer grupo comprende las llamadas constitutivas; desde el punto de vista numérico éstas se encuentran en proporción minoritaria con respecto al total; sin embargo, se trata de enzimas que están implicadas, en general, en aspectos centrales del metabolismo. Estas enzimas se producen continuamente, al margen de la presencia o no del sustrato. El segundo grupo, mucho más amplio, comprende las enzimas inductivas; éstas van siendo sintetizadas en proporciones muy bajas, aunque significativas, hasta que un sustrato adecuado pasa a estar disponible por el organismo. Entonces, dicho sustrato o un producto derivado de su degradación in-

duce un gran incremento de la síntesis. Es bastante común que en esas circunstancias la síntesis de una enzima inducible se multiplique por mil o incluso más.

Tanto si la enzima es constitutiva como inducida, existe un mecanismo posterior de control que también puede ser efectivo. En presencia de una fuente de carbono rápidamente asimilable, como la D-Glucosa, la síntesis de muchas enzimas se encuentra reprimida. La lógica que subyace en este fenómeno es que un organismo puede utilizar la glucosa sin necesidad de gastar energía en la síntesis de enzimas útiles para degradar otras fuentes carbonadas más complejas. La represión por un catabolito carbonado es un fenómeno que se da comúnmente en los microorganismos y que afecta a muchas enzimas constitutivas e inducibles. Por ello, puede ser muy difícil deducir si la síntesis transitoria de una enzima es el resultado de una inducción, de una represión o de la combinación de ambos mecanismos. La síntesis de ciertas enzimas puede ser reprimida por la presencia de compuestos que contengan nitrógeno, azufre y otros. (15,46)

Para los fines que este manual persigue no es apropiado describir aquí detalladamente los mecanismos de la inducción y la represión, pero sí vale la pena mencionar que uno de los ejemplos más claros e ilustrativos de estos mecanismos es el del metabolismo de la lactosa en el *Escherichia Coli*.

Los genes *lac z*, *lac y* y *lac a* para las proteínas B-galactosidasa, galactósido permeasa y tiogalactósido transacetilasa se encuentran agrupados en el cromosoma bacteriano formando el operón "*lac*". La transcripción de estos 3 genes es regulada por la región control de operón que consiste en el gen *lac i* y las regiones promotora y operadora. En la figura 3.1 se ilustra claramente el funcionamiento del operón "*Lac*".



*Figura 3.1* Operón *lac* del *Escherichia coli*. CAP = proteína activadora del catabolito.(15)

### **2.3.3. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN GENÉTICA**

Los recientes avances en la tecnología del ADN recombinante ofrecen muchas ventajas potenciales al enzímólogo industrial. Por ejemplo, hoy es posible la incorporación de un gen animal o vegetal a un microorganismo. En consecuencia, las enzimas difíciles de producir por medios convencionales pueden cosecharse con éxito aplicando la tecnología tradicional de la fermentación a los microorganismos recombinantes.

Aunque los métodos básicos de la tecnología del ADN recombinante ya están bien desarrollados, hay una serie de dificultades básicas a considerar, particularmente cuando se producen enzimas a partir de genes eucariontes. Otro punto sobre el que debe insistirse es que los experimentos de manipulación genética están sometidos a regulaciones legales estrictas en la mayoría de los países; efectivamente, antes del comienzo del trabajo, la estrategia concreta de donación ha de ser aprobada por un comité expreso. Además, los experimentos de clonación totalmente ortodoxos, que podrían ser aceptables en el laboratorio, requieren precauciones más severas cuando se efectúan a gran escala.

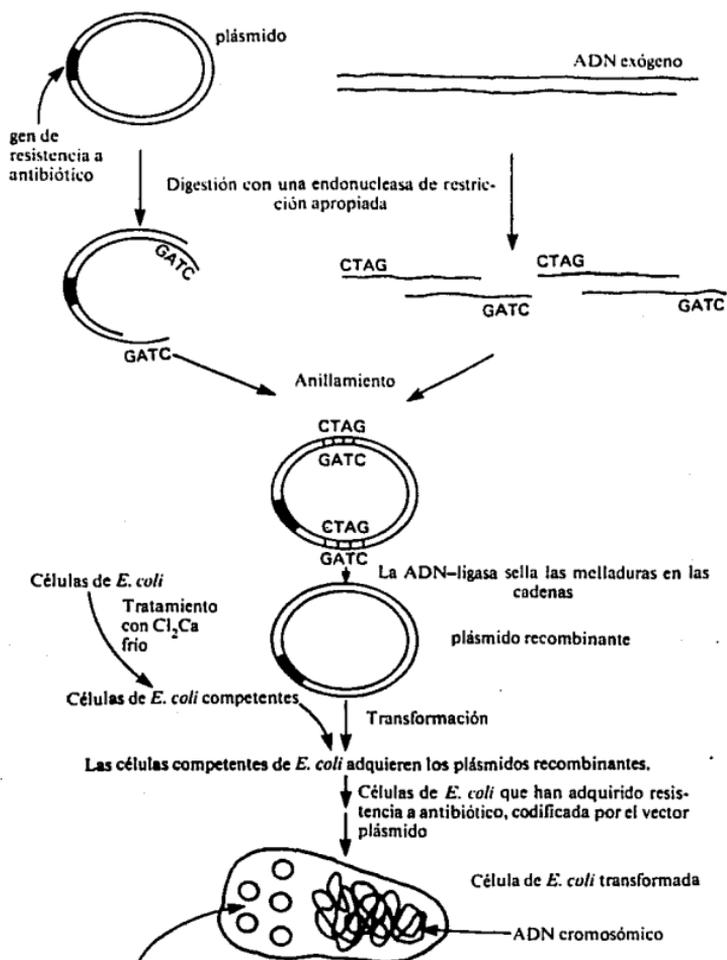
La clonación de genes se basa en el empleo de una serie de técnicas relativamente simples. Consisten, esencialmente en: 1) Capacidad de corte y unión de moléculas de ADN; 2) Introducción del ADN recombinante en un organismo huésped mediante el uso de los vectores de clonación adecuada; 3) Identificación de los clones deseados. La estrategia particular que se aplique depende de una serie de factores, algunos de los cuales se consideran en el punto siguiente.

(46)

### **2.3.4. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS POR TÉCNICAS DE INGENIERÍA GENÉTICA**

Una de las estrategias más simples para la producción de enzimas por Ingeniería Genética, consiste en la transferencia de un gen de un estirpe bacteriana a otra por medio de la clonación «shot-gun» (fig 3.2). Se aísla el ADN del organismo donante y se dirige parcialmente con una endonucleasa de restricción de tipo II, de especificidad adecuada. Las endonucleasas de restricción reconocen secuencias específicas de nucleótidos dentro de la molécula de ADN y cortan ambas cadenas, de manera roma o cohesiva. Si la enzima cataliza un corte cohesivo, los fragmentos de ADN poseerán el su extremo breves terminales monocatenarias adhesivas, capaces de establecer un emparejamiento de bases con otros fragmentos. Un vector de clonación adecuado, un plásmido, es cortado por la misma enzima. La combinación del vector cortado y los diversos fragmentos del ADN donante en las cantidades estequiometricas adecuadas conducen a una reasociación molecular al azar, mediante el apareamiento de los extremos cohesivos. Entre las muchas especies de moléculas recombinantes que se formarán existirán algunas en las que el vector estará asociado con el gen que interesa. Los enlaces fosfodiéster del esqueleto del ADN que se hayan roto pueden volver a formarse mediante una ADN-ligasa, proceso conocido como ligadura.

El paso siguiente consiste en persuadir a la bacteria huésped de que incorpore las moléculas recombinantes. El procedimiento a aplicar depende del tipo de vector, siendo los plásmidos los más simples. Una clase de plásmidos codifica para resistencias a un único o múltiples antibióticos y pertenecen a ella los que constituyen la base de los vectores de clonación. El proceso por el que se induce a la bacteria a la absorción de los plásmidos se conoce como transformación.



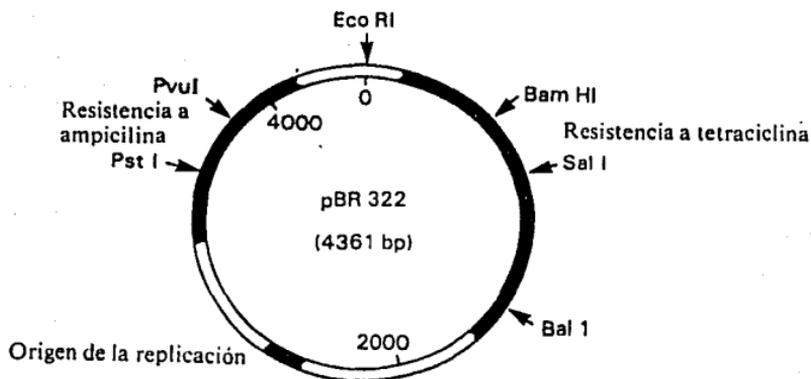
Las múltiples copias del plásmido recombinante contienen ADN que codifica para la resistencia a antibióticos, así como fragmentos del ADN exógeno

**Figura 3.2** Clonación "shot gun" del ADN en un plásmido vector. (15)

En esta técnica, la selección del clon apropiado se logra en dos etapas. La mayoría de los plásmidos utilizados como vectores de clonación, contienen dos o más genes de resistencia a antibióticos. Por ejemplo, el plásmido pBr 322 muy común contiene genes de resistencia a la ampicilina y tetraciclina (Fig. 3.3) y por ello, conferirán resistencia a la bacteria huésped frente a los dos antibióticos.

Recientemente se ha publicado un ejemplo magnífico de aplicación de las técnicas de clonación a la tecnología enzimática; se refiere a la quimosina de ternera. Una serie de compañías de biotecnología han empleado las técnicas del ADN recombinante y han logrado la expresión de la quimosina de ternera en el *E. Coli*. Se trata de un primer paso muy importante, pero en realidad un organismo esférico como el *E. Coli* no es la fuente ideal para la obtención de una enzima para degradar alimentos. Sin embargo, una relevante compañía holandesa de enzima ha anunciado recientemente, que ha logrado expresar el gen de la quimosina de ternera en la levadura *Kluyveromices sp.* Acoplado un proceso de purificación en un solo paso, la actividad de extracto es superior a la de preparaciones de quimosina obtenidas por métodos tradicionales. La gran ventaja que tiene clonar en *Kluyveromices* es que se trata de un organismo ya aprobado por las autoridades reguladoras del uso de productos alimenticios y, por ello, la aceptación de la enzima clonada no supone obstáculo importante. Está claro que este ejemplo no es sino uno de entre una serie creciente de preparaciones de enzimas clonadas aptas para uso industrial.

Como conclusión a este punto podemos decir que las técnicas de manipulación genética permitirán en el futuro la producción de muchas nuevas actividades, teniendo este aspecto un tremendo potencial, siendo de gran interés su explotación, e investigación a gran escala. (2, 8, 36)



**Figura 3.3**

Mapa del plásmido pBR 322. Se indican los genes de resistencia a antibióticos, junto con una selección de sitios exclusivos para enzimas de restricción. (15)

## 2.4 UNIDAD IV

### LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS

#### INTRODUCCIÓN

La extracción y purificación de una enzima presenta al enzimólogo frente a una paradoja. Normalmente, es necesario para aislar cada una de las enzimas, un proceso de purificación diferente; sin embargo, existen relativamente un número escaso de técnicas que permiten la separación de proteínas. No obstante, mediante el uso secuencial de un número de estas técnicas y para la explotación de las utilidades implicadas en la metodología, ha sido posible aislar un número elevado de enzimas en estado puro o prácticamente puro. Una de las finalidades de esta unidad es ilustrar los principios esenciales de la purificación enzimática e indicar algunas consideraciones sobre el proceso de cuantificar el grado de pureza del producto final.

En este punto es necesario preguntarse cuándo existe una necesidad para la purificación completa de una enzima. Esto ha llegado a ser casi axiomático en bioquímica ya que si una enzima presenta una elevada importancia entonces, de entrada, ella debería ser purificada hasta homogeneidad. Sin embargo para muchos propósitos biotecnológicos esto no es necesario y una amplia variedad de procesos resultarían antieconómicos si la enzima fuese completamente pura. Para la mayoría de las aplicaciones probablemente es suficiente un menor grado de purificación.

En esta unidad en primer lugar será considerada la extracción y purificación a nivel laboratorio y posteriormente se describirá el proceso a una escala superior. (27)

### 2.4.1. EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA

En primer lugar y como más importante se debe obtener un extracto adecuado del tejido que contiene la enzima. En el caso de muchas enzimas hidrolíticas sencillas de origen microbiano, la proteína se libera en el medio de cultivo y se separa de las células mediante centrifugación siendo ésta la única etapa necesaria. Esta técnica es particularmente adecuada para trabajos con bacterias gram + tales como el *Basillus Subtilis* (productora de la proteasa, subtilisina) y en menor grado para organismos gram - como la *Klebsiella pneumomae* (productora de la  $\alpha$  -1-G glucosidasa). Sin embargo, la presencia de una membrana externa en organismo gram - puede conducir a complicaciones y quizás solamente se libere parcialmente la enzima en el medio.

En algunos microorganismos eucarióticos, como en el caso de la levadura *kluveromices marxianus*, la enzima puede localizarse en la parte externa de la membrana celular pero no se libera en el medio de crecimiento. Frecuentemente, la liberación de la enzima implica una destrucción parcial o total de la célula.

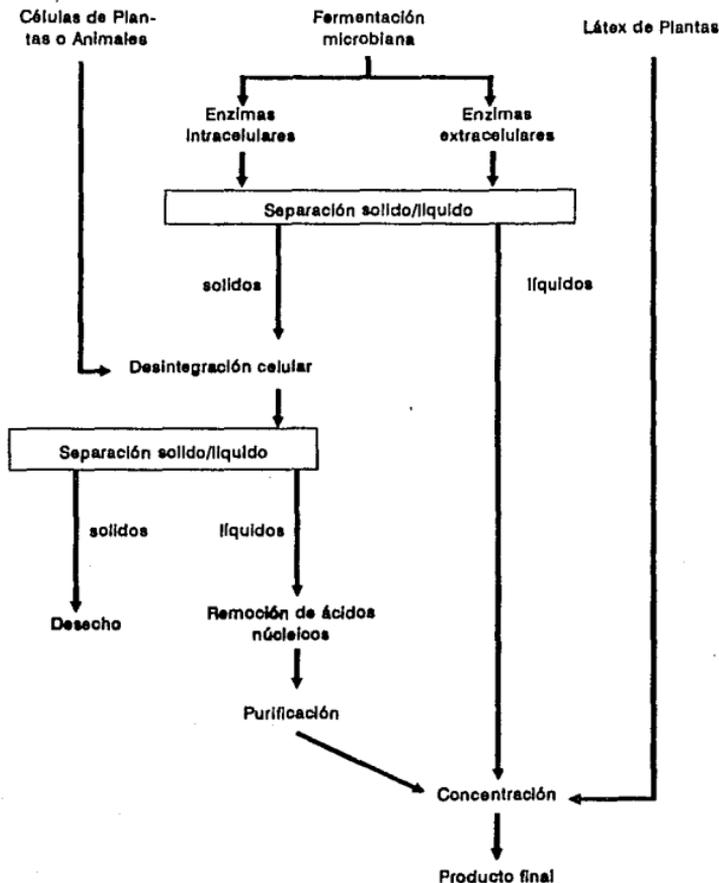
Para la obtención de enzimas intracelulares a partir de microorganismos se pueden producir problemas mayores que los descritos anteriormente. Las técnicas de lisis celular como es el caso de la disrupción mecánica (p.e. presión celular, molido con alumina), sonicación tratamiento con detergentes y choque osmótico, son entre otros, los que se han utilizado como más adecuados para liberar las enzimas intracelulares. En particular, las células bacterianas lisadas liberan cantidades superiores de ácidos nucleicos, por ello una de las primeras etapas en los procesos de purificación están encaminados a la eliminación de este contaminante.

Las técnicas que se usan para la extracción de enzimas a partir de tejidos de animales son, en conjunto, similares a las empleadas para la obtención de enzimas intracelulares de microorganismos eucariotes (p.e. levaduras). La homogeneización del tejido seleccionado en una solución tampón adecuada, es la técnica más ampliamente utilizada. Como segundo paso se utiliza, a menudo, la centrifugación diferencial, para seleccionar la subfracción celular o el organelo apropiado. El aislamiento de un organelo específico, puede que por sí mismo, proporcione una purificación considerable de la enzima, aunque a gran escala esto no pueda realizarse de manera práctica.

La extracción de la enzima a partir de tejidos vegetales presenta un nuevo conjunto de problemas y el número comparativamente pequeño que han sido aisladas es en parte un reflejo de las dificultades que se van a presentar. Las paredes celulares vegetales son un reto importante para el enzimólogo. Las fuerzas necesarias para destruir esta barrera celular son tan elevadas como para provocar generalmente, durante todos los procesos, la desnaturalización de las enzimas deseadas. Sin embargo, existen diversos ejemplos de enzimas útiles que han sido obtenidas a partir de plantas por métodos sencillos mediante procesos biotecnológicos, p.e. las proteasas bromelina (piña) y papaína (papaya).

El pH, la fuerza iónica y la composición del medio que se utiliza para la extracción de una enzima son de gran importancia en este proceso y en las etapas posteriores de la purificación. En el diagrama de flujo 4.1 se ilustran las etapas que se deben seguir para extraer una enzima de alguna de sus fuentes naturales.

*Etapas necesarias para la extracción de una enzima*



*Diagrama 4.1*

(Tomado de Chaplin y Bucke 1991)

### 2.4.2. PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA

Es probable que la enzima que uno desea se encuentre presente en el medio de extracción solamente en una proporción mínima frente al total de proteínas (generalmente 0.01-1%). Por ello, en las primeras etapas de la purificación enzimática deberían encaminarse a la eliminación de gran parte de sus proteínas contaminantes, tanto como sea posible y de la forma más fácil. Idealmente, podría efectuarse sacando partido de alguna faceta particular de la estabilidad de la enzima bajo condiciones adversas. En la tabla 4.1 se muestra el efecto del número de etapas sobre la rentabilidad y costo de un proceso típico de purificación enzimática.

Tabla 4.1

Etapa	Peso relativo	Rendimiento(%)	Actividad específica	Costo total	Costo por peso	Costo por actividad
	1.000	100	1	1.00	1	1.00
1	0.250	75	3	1.10	4	1.47
2	0.063	56	9	1.20	19	2.13
3	0.016	42	27	1.30	83	3.08
4	0.004	32	81	1.40	358	4.92
5	0.001	24	243	1.50	1536	6.32

(Tomado de Chaplin and C. Bucke, 1990.)

A continuación se describirán brevemente las principales técnicas de purificación de enzimas.

### FRACCIONAMIENTO

Puede ser muy efectivo el calentar la muestra o ajustar a valores extremos el pH. Por ejemplo, la aspartato aminotransferasa puede aislarse a partir de corazón de cerdo mediante calentamiento breve (20 minutos), del medio de extracción a 72°C en presencia del sustrato  $\alpha$ -oxoglutarato y del inhibidor competitivo, el succinato. Otro ejemplo es el de la enzima Hialuronidasa, que es de interés farmacéutico, la cual, se obtiene de forma adecuada a partir de testículos de buey, utilizando una mezcla de ácido clorhídrico a pH de 2.1. Una gran parte de las proteínas contaminantes, incluyendo a la  $\beta$ -galactosidasa, son desnaturalizadas y precipitadas mediante la aplicación de esta metodología.

El fraccionamiento con sulfato amónico es una etapa extremadamente efectiva en la purificación proteica. La técnica tiene la ventaja adicional que reduce el volumen de material, lo cual, es normalmente un punto importante a considerar a este nivel.

El método tiene dos inconvenientes. El sulfato amónico contiene trazas de metales pesados que pueden ser suficientes para inactivar a una enzima; (problema que se evita usando sulfato amónico de gran pureza). La otra desventaja es que la preparación enzimática contiene una elevada concentración de sulfato amónico y normalmente esta sal debe eliminarse mediante diálisis, ultrafiltración o columnas de desalado antes de continuar con las siguiente etapa de purificación.

Una alternativa al fraccionamiento con sulfato amónico es la utilización de solventes orgánicos, particularmente acetona o alcoholes, para fraccionar proteínas. Los solventes deberían ser usados solamente a temperaturas bajas (0°C), de otra manera la mayoría de las enzimas se desnaturalizarían rápidamente.

Para enzimas intracelulares de origen bacteriano, es bastante aconsejable eliminar los ácidos nucleicos en esta etapa. Estos compuestos pueden ser precipitados con sulfato de protamina o, alternativamente, por la unión a una columna de intercambio aniónico, (p.e. DEAE-celulosa), quedando la enzima libre en la solución.

#### **CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO**

La separación de proteínas sobre la base de cargas, características mediante cromatografía de intercambio iónico, es uno de los métodos de purificación más empleados. Los intercambiadores iónicos están formados por un polímero prácticamente inerte, normalmente poliestireno o celulosa. Los intercambiadores iónicos con celulosa se emplean preferentemente para la mayoría de las purificaciones puesto que este polímero tiene una densidad de carga más baja y tiende a formar menos interacciones no específicas con las proteínas. Las resinas intercambiadoras iónicas pueden ser utilizadas bien en porción o en columnas cromatográficas. La primera posibilidad tiende a ser empleada con soluciones proteicas muy impurificadas mientras que la metodología en columna es más utilizada y se suele aplicar a la resolución de mezclas complejas en las etapas finales de la purificación.

En general, las proteínas se aplican a una columna en unas condiciones que faciliten al máximo las uniones y así se

eluirán selectivamente mediante cambios en las condiciones iónicas. De este modo, para un intercambiador catiónico, p.e. *CM-celulosa*, la fuerza iónica baja y un pH=5 son unas condiciones ideales para fijar las proteínas en la resina.

En la cromatografía de intercambio iónico la mezcla proteica cruda se aplica a la columna a baja fuerza iónica y a un pH aproximadamente de 8. Las enzimas se eluyen secuencialmente incrementando la fuerza iónica, disminuyendo el pH, o combinando ambos métodos. La cromatografía de intercambio iónico tiene la ventaja adicional de que los ácidos nucleicos pueden ser ligados al *DEAE-celulosa* y así eliminarse de la solución enzimática. Es importante aclarar que para emplear un intercambiador iónico de forma totalmente ventajosa es importante que la solución enzimática purificada se adicione a la columna en un tampón de baja fuerza iónica y preferentemente en el mismo amortiguador que ha sido utilizado para equilibrar la columna.

### **CROMATOENFOQUE**

Una variante de la cromatografía de intercambio iónico particularmente útil y eficaz, es la técnica de cromatoenfoco. Las proteínas son eluidas de una columna de intercambio iónico utilizando un amortiguador cuidadosamente seleccionado, y como el propio nombre del método indica un efecto de enfoque tiene lugar, de un modo bastante prometedor, es concentrada la enzima de interés. En el cromatoenfoco la columna se equilibra con un tampón y ahora, después de la aplicación de la muestra, se utiliza un segundo amortiguador de pH diferente para la elución. Esta metodología produce unas separaciones altamente resolutivas aunque presenta desventajas, ya que para operaciones a gran escala es un proceso caro. Sin embargo, es cierto que

el efecto de enfoque permite una carga superior de la columna si lo comparamos con el intercambiador iónico comercial.

### **CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL**

Una de las fases finales en el proceso de purificación de una enzima es frecuentemente la separación de acuerdo con el tamaño molecular. Las esferas de polisacáridos con enlaces cruzados tales como el *Sephadex* (polímeros de dextranos) y *Sepharosa* (polímero de agarosa), son los materiales empleados con mayor frecuencia en la cromatografía de filtración en gel. El método está basado en la capacidad de una molécula determinada para penetrar en los poros de las partículas del gel.

Compuestos con un tamaño molecular elevado no pueden penetrar en los poros y serán eluidos rápidamente en la fase móvil. Las moléculas de menor tamaño pueden penetrar en las partículas del gel, teniendo acceso a la fase estacionaria, siendo eluidas de la columna más tarde. Por ello, las moléculas proteicas se eluyen de la columna en orden decreciente de su tamaño molecular. Con cuidado, esta metodología puede permitir etapas de purificación en donde el porcentaje de recuperación de la actividad enzimática sea del 100%.

Aunque la filtración a través de geles utilizando *Sephadex* o compuestos relacionados es una técnica extremadamente útil, existen una serie de desventajas que deben ser consideradas como son. La cantidad de muestra que puede aplicarse al gel está limitada generalmente a un 1-2% del volumen total de la columna. El *Sephadex* y la *Sepharosa* tiende a empaquetarse, por ello, se debe cuidar el no exceder la presión hidrostática máxima de la columna.

### **CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD**

Una técnica más reciente para la purificación de proteínas es la cromatografía de afinidad. Este método utiliza la interacción específica entre una enzima y un ligando adecuado inmovilizado como puede ser el propio sustrato, el producto, la coenzima o algún otro compuesto, p.e. ciertos colorantes orgánicos.

Mediante la cromatografía de afinidad sería posible, en circunstancias ideales, retener solamente una enzima específica por el paso de un extracto proteico crudo a través de una columna conteniendo un ligando. Posteriormente, la enzima ligada podría eluirse utilizando concentraciones de sustrato bajas, coenzima o alguna otra molécula adecuada.

Una modificación de la cromatografía de afinidad es el fraccionamiento de enzimas sobre inmunoabsorbentes. Esto es posible, empleando anticuerpos suficientes para la enzima y fijándolos a una matriz adecuada. La gran afinidad entre el anticuerpo y el antígeno (la enzima en este caso), permitirá el que tenga lugar la unión selectiva de la enzima específica.

No obstante, esta es una técnica cara para la purificación de enzimas y se han limitado bastante sus posibles aplicaciones. (8, 15, 27)

### **2.4.3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN A GRAN ESCALA**

La mayor parte de los principios que han sido descritos para el aislamiento y purificación de enzimas, pueden adaptarse para operar a gran escala, aunque la metodología detallada anteriormente en algunos casos puede ser bastante diferente. Algunos problemas de ingeniería tales como el flujo de fluidos, transferencia de masa y de calor, que no presentan consecuencias en el laboratorio pueden presentar una importancia en el caso de procesos a gran escala.

La liberación de enzimas intracelulares por medios mecánicos, está bastante restringida al uso de molino de bolas y a homogeneizadores de alta presión. ( fig. 4.1 ).

La centrifugación de los materiales también presenta un problema en los procesos a gran escala. Las velocidades de centrifugación altas son impracticables cuando la fuerza de gravedad es elevada, lo cual podría representar un peligro para la utilización de esta técnica a escala industrial. En este sentido, se ha puesto a prueba la utilización de centrifugas de rotores tubulares y centrifugas con rotores de disco (fig. 4.2).

La diálisis y la concentración de soluciones diluidas de enzima son llevadas a cabo más adecuadamente empleando aparatos de ultrafiltración.

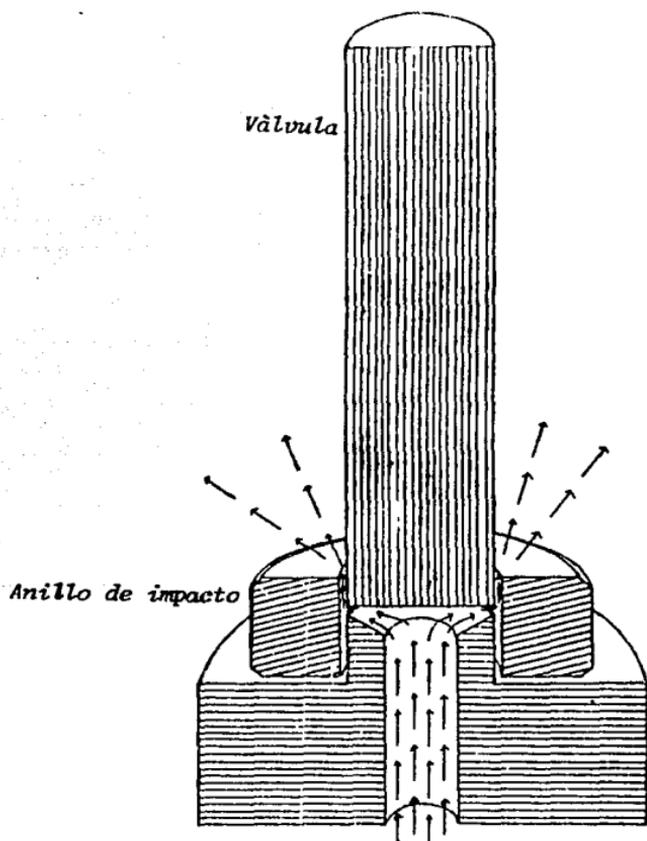


Figura 4.1 Homogeneizador de alta presión.(8)

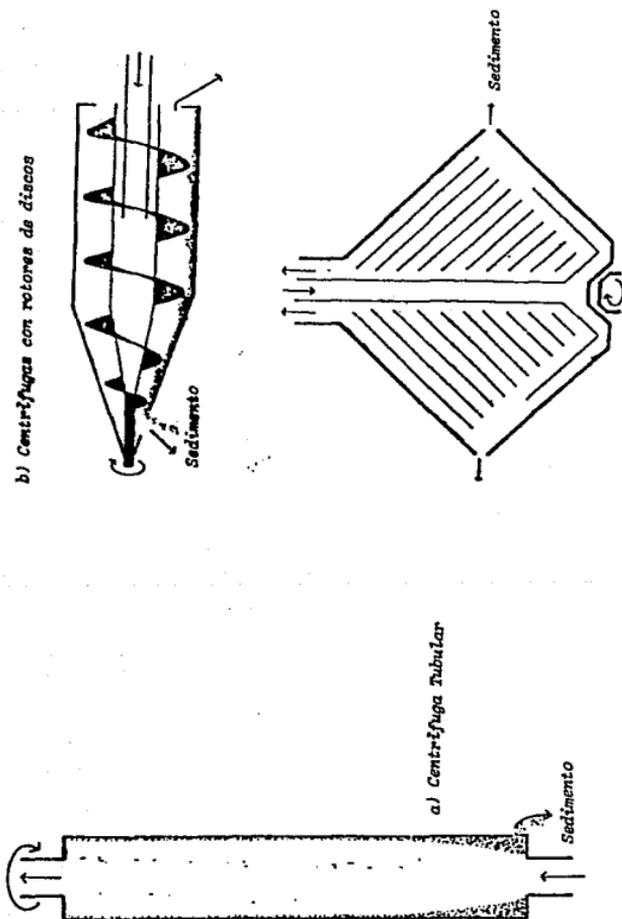


Figura 4.2 Diseños básicos de centrifugas industriales.(8)

Un método que puede servir y ser de utilidad para la obtención y purificación de enzimas a gran escala es la extracción líquida en sistemas de fase acuosa. Generalmente, las fases del sistema pueden ser producidas utilizando combinaciones diversas bien de polietilenglicol/fosfato potásico o polietilenglicol/dextrano crudo. La técnica separa los restos celulares proteínas contaminantes, ácidos nucleicos y polisacáridos sin tener que usar equipos de centrifugación o filtración ( figura 4.3 ).

Es difícil generalizar sobre los métodos a gran escala, ya que cada proceso presentará sus propios inconvenientes. Sin embargo, la mayoría de las técnicas disponibles para la purificación de proteínas pueden ser adaptadas de alguna manera a la producción a gran escala. (8)

#### **2.4.4. ESPECIFICACIONES**

Se han producido algunas enzimas para usos comerciales de acuerdo a ciertas especificaciones. En particular existen regulaciones rigurosas sobre la fuente, y uso de enzimas en las industrias farmacéuticas y de alimentos. Además cada país tiene su conjunto de regulaciones, muchas de las cuales son incompatibles con las de otras naciones.

Para preparaciones de enzimas relativamente impurificadas es suficiente indicar la fuente garantizando un mínimo de actividad específica. Además, a menudo es útil conocer las actividades de proteínas contaminantes que pueden mostrar un efecto perjudicial sobre la aplicación indicada. Naturalmente, la mayoría de las casas comerciales que disponen de enzimas aportan bastantes más datos superando las especificaciones mínimas. (15)

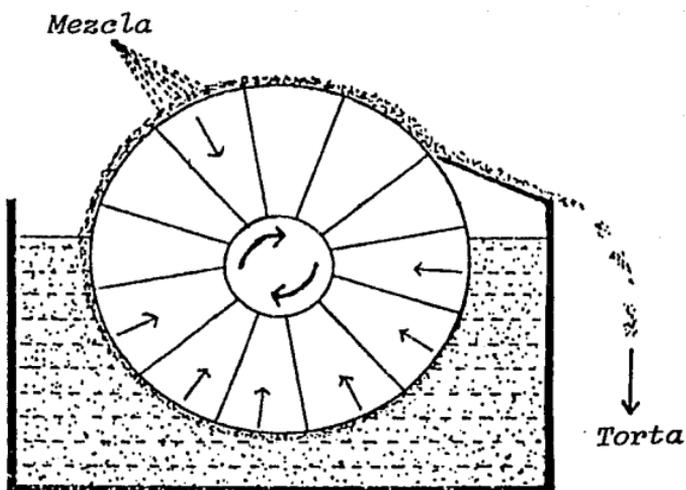


Figura 4.3

Diseño básico de un filtro rotatorio.(8)

## 2.5 UNIDAD V

### PROPIEDADES CINÉTICAS Y DISEÑO DE REACTORES

#### 2.5.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Los estudios cinéticos representan uno de los instrumentos empleables por el bioquímico en la investigación de la estructura y función de las enzimas, de tal forma que han podido desarrollarse una gran variedad de modelos mecánicos. Sin embargo, cuando se considera la aplicación tecnológica de las enzimas, los objetivos están muy claramente definidos y es a menudo suficiente limitarse al examen de los efectos netos de la acción de una enzima más que llevar a cabo un detallado estudio cinético.

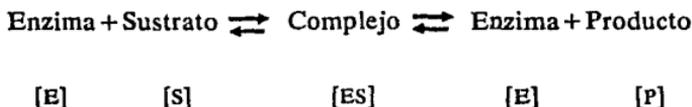
Al estudiar la aplicabilidad comercial de un catalizador enzimático existen tres puntos principales que deben ser tomados en cuenta:

1. La velocidad de reacción (actividad catalítica)
2. La extensión de la reacción (constante de equilibrio)
3. La duración de la actividad (estabilidad)

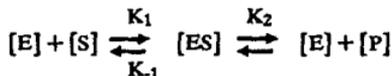
La importancia relativa de estos puntos depende de la aplicación deseada. Por ejemplo, en un sensor sería necesaria una enzima estable, mientras que la extensión de la reacción podría no ser crítica; sin embargo, en un sistema de producción los tres factores deben ser considerados. En cualquier caso, el costo será un factor primordial. (15)

### 2.5.2. VELOCIDAD DE REACCIÓN

Las enzimas, como catalizadores que son, aceleran las reacciones químicas, pero ellas mismas no resultan irreversiblemente modificadas. El aumento de la velocidad se atribuye al descenso de la energía de activación de la reacción. Partiendo de lo anterior podemos proponer el esquema de reacción siguiente:



La etapa de formación del complejo se considera reversible, ya que el complejo tiene un estado energético semejante a la mezcla enzima-sustrato. La rotura subsiguiente del complejo para rendir los productos se considera exotérmica, esta etapa puede ser prácticamente irreversible en muchos casos. La expresión de velocidad para este tipo de reacción se obtiene usualmente empleando una hipótesis de estado estacionario, esto es, la concentración del complejo permanece constante.



Aceptando la hipótesis del estado estacionario tenemos:

$$d[ES]/dt = k_1 [E] [S] - (k_{-1} + k_2) [ES] = 0$$

Por lo tanto,

$$K_1 [E] [S] = (K_1 + K_2) [ES]$$

Para que esta hipótesis sea válida, la velocidad de reacción debe ser lineal, por lo tanto, se determina usualmente tan próxima al tiempo cero como sea posible, antes de que la concentración cambie apreciablemente (velocidad inicial).

La ecuación anterior puede ser reordenada para dar:

$$[E] [S]/[ES] = [(K_1 + K_2)/K_1] = K_m \quad (1)$$

$K_m$  = constante de Michaelis.

La ley de la conservación de la masa requiere que la concentración de enzima ( $E_0$ ) no cambia.

$$[E_0] = [ES] + [E]$$

Por lo tanto

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (2)$$

Sustituyendo  $[E]$  en la ecuación (1) y reordenando queda

$$[ES] = ([E_0] [S]) / (K_m + [S]) \quad (3)$$

Las dimensiones de esta expresión son unidades de concentración. La constante de velocidad  $K_2$  es de primer orden y tiene unidades de tiempo<sup>-1</sup>. Multiplicando ambos miembros de la ecuación (3) por  $K_2$  obtendremos la velocidad de cambio de la concentración de producto con el tiempo en función de la velocidad máxima posible, la constante de Michaelis y la concentración del sustrato.

$$dP/dt = K_2 [ES] = (K_2 [E_0] [S]) / (K_m + [S])$$

Que usualmente se escribe como

$$v = (v_{m\acute{a}x} [S]) / (K_m + [S]) \text{ la ec. de Michaelis-Menten (4)}$$

Para predecir el comportamiento de un sistema enzimático es necesario determinar  $v_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  para la enzima particular empleada. Esto puede hacerse midiendo la velocidad inicial de la reacción en un rango de concentraciones de sustrato. La ecuación (4), muestra que a valores de  $[S]$  mucho menores que  $K_m$  la expresión puede simplificarse a:

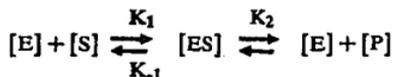
$$v = (v_{m\acute{a}x} [S]) / K_m \text{ primer orden, ya que } K_m + [S] = K_m$$

A valores de  $[S]$  mucho mayores que  $K_m$ , la ecuación (4) se aproxima a:

$$v = (v_{m\acute{a}x} [S]) / [S] \text{ orden 0}$$

### 2.5.3. EXTENSIÓN DE LA REACCIÓN

En la práctica, no todas las reacciones catalizadas por enzimas son irreversibles, y por lo tanto, en algunos casos debemos determinar el punto de equilibrio de la reacción. Considerando el caso de una reacción reversible con formación de un complejo intermedio, tenemos



En el equilibrio, las velocidades en ambas direcciones son iguales, por lo tanto

$$K_1 [E] [S] = K_1 [ES]$$

$$K_2 [E] [P] = K_2 [ES]$$

reordenando:

$$[ES]/[E] = (K_1/K_1) [S] = (K_2/K_2)[P]$$

La constante de equilibrio  $K_{eq}$  es igual:

$$[P]/[S] = (K_1 K_2)/(K_1 K_2)$$

Ya que las constantes de velocidad individuales no pueden ser determinadas con facilidad, la constante de equilibrio debe ser expresada en función de  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  en ambas direcciones.

*Reacción directa*

*Reacción inversa*

$$V_{m\acute{a}x} (f) = K_2[E_0]$$

$$V_{m\acute{a}x} (b) = K_1 [E_0]$$

Por lo tanto,

$$(V_{m\acute{a}x} (f))/(V_{m\acute{a}x} (b)) = (K_2 [E_0])/(K_1 [E_0])$$

Como anteriormente,

$$K_m (f) = (K_1 + K_2)/K_1$$

De forma similar

$$K_m (b) = (K_1 + K_2)/K_2$$

Por lo tanto,

$$K_m (b)/K_m (f) = [(K_2 + K_1) / K_1] / [(K_2 + K_1) / K_2]$$

Y entonces,

$K_{eq} = [V_{m\acute{a}x} (f) K_m(b)]/[V_{m\acute{a}x}(b) K_m (f)]$ la reacción de Haldane (15,12,46)
--

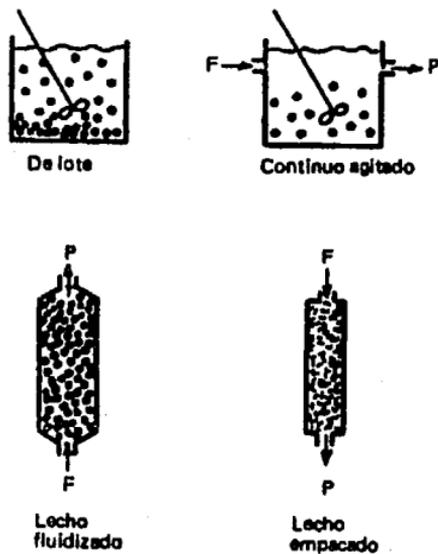
### **2.5.4. ASPECTOS DEL DISEÑO DE REACTORES ENZIMÁTICOS**

Por ser este tipo de reactores únicos en cuanto a sus características y en virtud de que la ingeniería de enzimas inmovilizadas aun se encuentra en sus inicios, es muy difícil establecer generalizaciones, pues en el mayor de los casos, la experiencia es limitada. El tipo de reactor, su comportamiento cinético y la transferencia de masa son factores que afectan y determinan el proceso enzimático y su operación. (17)

Los reactores enzimáticos son de varios tipos siendo los principales:

- a) Reactor batch (tanque agitado).
- b) Reactor continuo agitado.
- c) Reactor de lecho fijo.
- d) Reactor de lecho fluidizado.

Estos cuatro tipos de reactores ( fig. 5.1 ) pueden ser clasificados dentro de dos grandes grupos debido a su principio de funcionamiento, estos dos grandes grupos son: reactores de flujo tapón (c, d) y de retromezclado (a, b) basándonos en estos dos grupos y tomando el volumen del reactor ( $V_r$ ) como parámetro primordial de diseño a continuación explicaremos los principales aspectos de diseño de reactores enzimáticos.



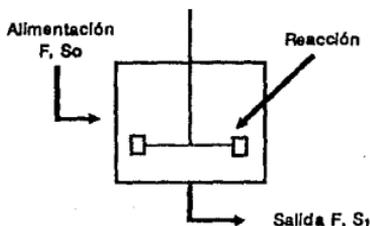
*Figura 5.1* Tipos de reactores enzimáticos. (37)

**REACTOR DE RETROMEZCLADO**

Para diseñar un reactor lo primero que debe hacerse es establecer una ecuación básica del balance de materia del sustrato o del producto que entran al reactor. En general:

$$\text{Alimentación-Salida} = \text{Acumulación} + \text{Reacción} \quad (1)$$

Para esta derivación se considera que el reactor opera en estado estacionario, con un volumen constante; por lo tanto, el término acumulación desaparece.



Donde:

$F$  = Flujo

$S_0$  = Concentración de entrada

$S_1$  = Concentración de salida

$V_r$  = Volumen de reactor

El balance de materia para el sustrato es el siguiente:

$$\text{Alimentación} = F S_0 \quad (2)$$

$$\text{Salida} = F S_1 \quad (3)$$

El término reacción depende de la cinética y puede expresarse como:

$$\text{Reacción} = (\text{velocidad}) (\text{volumen}) = vV_1$$

En este caso se considerará que la velocidad de reacción se expresa como:

$$v = (V_{\text{máx}} [S]) / (K_m + [S]) = (K E S) / (K_m + [S]) \quad (4)$$

Donde:

**v** = Velocidad de reacción

**S** = Concentración del sustrato

**K** = Número de recambio

**E** = Concentración de la enzima

**K<sub>m</sub>** = Constante de Michaelis-Menten

Aplicando (2), (3) y (4) a (1) se obtiene:

$$F S_0 - F S_1 = (K E S_1 / K_m S_1) V_r \quad (5)$$

$$F(S_0 - S_1) = (K E S_1 / K_m + S_1) V_r \quad (6)$$

Si definimos  $X$  como la fracción del sustrato convertida en producto:

$$X = (S_0 - S_1) / S_0 \quad (7)$$

$$A = F S_0 X \quad (8)$$

Y sustituyendo en (6) y reorganizando

$$V_r = A / k E \{ 1 + K_m / S_0 (1 - X) \} \quad (9)$$

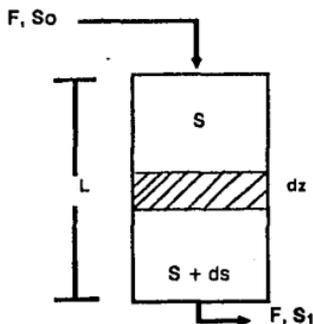
La ecuación (9) expresa el volumen del reactor de retromezclado en función del flujo de operación, de la concentración de entrada, de la concentración de enzima y del grado de conversión. (11)

**REACTOR DE FLUJO TAPÓN**

Para poder comparar ambos casos es necesario que la columna empacada tenga las siguientes características:

- La enzima puede ser inmovilizadas en un soporte adecuado para empacar la torre, y
- La concentración de la enzima debe ser la misma en ambos casos.

Para la columna empacada



Torre con un diámetro  $d$ , área de flujo  $A_0$  y con una velocidad de flujo  $V_0$

Balance en el elemento dz:

$$\text{Entrada} = FS \quad (10)$$

$$\text{Salida} = F (S + dS) \quad (11)$$

$$\text{Acumulación} = 0 \quad (12)$$

$$\text{Reacción} = A_0 dz (KES/K_m + S) \quad (13)$$

Rearreglando se obtiene

$$-FdS = A_0 dz (K[ES]/K_m + S) \quad (14)$$

$$(dS K_m + S)/S = (-A_0/F) dz KE \quad (15)$$

Integrando de  $S_0$  a  $S_1$  y  $Z=0$  a  $Z=L$

$$K_m \ln (S_1/S_0) + (S_1 - S_0) = -V_F(KE/F) \quad (16)$$

Utilizando (7) y (8) de nuevo

$$K_m/S_0 \ln (1-X) - X = (-V_F \times KE)/F \quad (17)$$

Despejando  $V_F$

$$V_F = A/KE \{ 1 - (K_m/S_0 X) \ln (1-X) \} \quad (18)$$

La ecuación (18) expresa el volumen de un reactor ideal de flujo tapón con los mismos términos que el reactor de retromezclado.

Para comparar ambos sistemas debe dividirse la ecuación (9) por la (18) obteniéndose:

$$\frac{v_F}{v_r} = \frac{1 - (K_m/S_0 X) \ln(1-X)}{1 + K_m/S_0(1-X)} \quad (19)$$

Al analizar ambos casos observamos que cuanto mayor es el grado de conversión y menor la concentración de entrada, más *eficiente es el reactor de tipo tapón*.

Las reacciones de orden mayor y los sistemas con inhibición por producto se beneficiarán aún más con el reactor de flujo tapón. Es frecuente que en el caso de las columnas empacadas el tamaño de la partícula sea un factor importante; debe hacerse, pues, una evaluación entre las limitaciones por difusión que disminuirán con partículas pequeñas y el aumento en la caída de presión que causaran las mismas. (37)

#### COMPORTAMIENTO DE REACTORES ENZIMÁTICOS

Se puede anticipar el comportamiento de reactores ideales conociendo la cinética de la reacción y el modo de operación del reactor. Ya han sido considerados dos tipos de reactores, solo resta por analizar el "batch". Los otros reactores, no ideales, generalmente se comportan en regiones delimitadas por los casos ideales.

Para un reactor batch, considerando una cinética de tipo Michaelis-Menten, se puede obtener la ecuación integrada entre el tiempo cero al tiempo t:

$$KEt/V_s = S_0X - K_m \ln(1-X) \quad (20)$$

Donde t = tiempo para alcanzar la conversión X, y  
V<sub>s</sub> = volumen de la solución del sustrato.

### TRANSFERENCIA DE MASA

Los efectos de las limitaciones por transferencia de masa externa se observan en las velocidades de reacción y pueden determinarse por varios métodos.

La velocidad de transferencia de masa del seno de la solución a la superficie puede expresarse como:

$$V = K_m a_m (S'_0 - S_s) \quad (21)$$

Donde:

S'<sub>0</sub> = concentración de enzima en el seno de la solución

S<sub>s</sub> = concentración del sustrato en la superficie

a<sub>m</sub> = área superficial por unidad de volumen

K<sub>m</sub> = coeficiente de transferencia de masa (longitud/tiempo)

En el estado estacionario esta velocidad de transferencia de masa debe ser igual a la velocidad de reacción en la superficie o a la velocidad aparente de reacción dentro del sólido. Por lo tanto, cuando las limitaciones por difusión interna no son significativas y se emplea una cinética del tipo Michaelis-Menten, se obtiene la siguiente expresión en el caso de régimen estacionario:

$$V = K_m \text{ am}(S'_o - S_s) = (KESs)/(K_m + Ss) \quad (22)$$

Si resolvemos la ecuación (21) para  $S_s$ , sustituimos dicha solución en la ecuación (22) y además rearreglamos en la forma de Lineweaver-Burk obtendremos:

$$1/V = (1/V_{\text{máx}}) + ((K_m)/V_{\text{máx}})((1)/S'_o) (1)/(1-v)/(S'_o K_m \text{ am}) \quad (23)$$

Donde  $V_{\text{máx}} = KE$

Si  $S'_o$  tiende al infinito, entonces  $v$  tiende a  $V_{\text{máx}}$ , y la ecuación (23) se aproxima a:

$$1/V = (1/V_{\text{máx}}) + (K_m/V_{\text{máx}})(1/S'_o) \quad (24)$$

Cuando  $S_o$  tiende a ser 0, la ecuación (23) se convierte en:

$$1/V = (1/K_m \text{ am} + K_m/V_{\text{máx}}) 1/S'_o \quad (25)$$

No se debe olvidar que además de los efectos por limitación de transferencia de masa, deben considerarse los efectos electrostáticos de mezclado, de temperatura, de estabilidad, etcétera, que hacen que la interpretación de la cinética de las enzimas inmovilizadas colocadas dentro de reactores biológicos, sea un aspecto difícil y complicado aunque interesante, y estimulante para la imaginación, por lo que se refiere a tomar en cuenta todas las limitaciones que puedan aparecer en los casos prácticos. (37)

## NOMENCLATURA

Símbolo	Interpretación	Unidades
A	Cte. de Arrhenius	
D	Tasa de dilución	$S^{-1}$
$\epsilon$	Volumen de exclusión del lecho	
E	Energía de Activación	$KJ Kg mol^{-1}$
[E]	Concentración de enzima activa	
[Eo]	Concentración total de la enzima activa	$Kg mol m^{-3}$
[Et]	Concentración de la enzima activa después del tiempo t	$Kg mol m^{-3}$
[ESS]	Concentración del complejo enzima-sustrato inactivo	$Kg mol m^{-3}$
[EP]	Concentración del complejo producto-enzima inactivo	$Kg mol m^{-3}$
$K_1$	Cte. de velocidad de 2o. orden	$Kg mol m^{-3}$
$K_{-1}$	Cte. de velocidad de 1o. orden	$S^{-1}$
$K_2$	Cte. de velocidad de 1o. orden	$Kg mol m^{-3}$
$K_2$	Cte. de velocidad de 1o. orden	$S^{-1}$
Kd	Cte. de inactivación de primer orden	$S^{-1}$
Km	Constante de Michaelis	$Kg mol m^{-3}$
Ki	Constante de Inhibición	$Kg mol m^{-3}$
Keq	Constante de equilibrio	
[P]	Concentración del producto	$Kg mol m^{-3}$
Q	Caudal volumétrico	$m^3 S^{-1}$
[S]	Concentración del sustrato	$Kg mol m^{-3}$
T	Temperatura	
v	Velocidad observada de la reacción	$Kg mol m^{-3}$
V	Volumen del reactor	$m^3$
X	Conversión fraccional	

## 2.6 UNIDAD VI

### INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

#### 2.6.1. INTRODUCCIÓN

En cualquier valoración de los pros y los contras de un sistema biológico en un contexto tecnológico, los problemas de su estabilidad limitada alcanza su máxima expresión. Está claro que la estabilidad está inexplicablemente unida a los costos del proceso y, como tal, es un factor central que debe ser considerado en cualquier valoración de factibilidad. Para un bioquímico «puro» la estabilidad es quizás un concepto artificial; mientras que es importante en contexto de los procedimientos experimentales. Es difícil, si no imposible, relacionar la estabilidad "in vivo" con la observada "in vitro". Sin embargo, el biotecnólogo está más interesado en los métodos de utilización que en las condiciones que tienen relevancia biológica y así es capaz de investigar una extensa gama de aproximaciones que puedan modificar la estabilidad o inestabilidad aparente de la enzima en cuestión. (15,37)

#### 2.6.2. ESTABILIDAD ENZIMÁTICA

La estabilidad de una enzima dada, es función compleja de las condiciones ambientales utilizadas. La estabilidad varía con el pH, la [S] y la presencia de agentes desestabilizantes. Generalmente, la inactivación enzimática es atribuida a efectos térmicos, siendo la velocidad de primer orden y reflejando las propiedades de la enzima en su entorno local.

$$d[E]/dt = -K_d[E_0]$$

Esta ecuación puede integrarse para obtener la concentración de enzima activa en el tiempo t ([Eto]):

$$[Eto] = [E^o] \exp (-K_d.t)$$

Para que una enzima sea apropiada en una aplicación comercial, su estabilidad debe ser suficiente para dicha aplicación. En el caso de un reactor la estabilidad vendrá cuantificada en términos del beneficio obtenido del producto formado durante el tiempo de vida del catalizador enzimático. Para un sensor basado en enzimas el criterio estaría basado generalmente en la necesidad de una respuesta lineal a lo largo de un periodo de tiempo. Además la estabilidad operacional debe considerarse la facilidad y el costo de almacenaje.

La valoración de la estabilidad, tanto para el almacenaje como para la operación, se hace generalmente en términos de vida media, o sea el tiempo requerido para disminuir a la mitad la actividad enzimática.

$$[Et] = [Eo]/2 \text{ por lo tanto } [Eo] \exp (-K_d.t)$$

Por lo tanto,

$$\ln (0.5) = -K_d.t \text{ y } t_{1/2} = 0.693/K_d$$

Como ya se menciona, la estabilidad de una enzima no es igual durante el almacenaje que cuando esta se transfiere y se incluye en el proceso de producción, por esta razón las formas de evaluar la estabilidad de una enzima son diferentes en cada caso, siendo necesario hablar de ello por separado.

### **ESTABILIZACIÓN PARA EL ALMACENAJE**

Debe hacerse una distinción entre la estabilidad para el almacenaje y la estabilidad para la operación. En el caso de un reactor enzimático de alto rendimiento, los factores de costo pueden excluir la adición continua de un estabilizador, el cual, puede ser conveniente utilizar durante el almacenaje.

La mayoría de las enzimas han demostrado ser moderadamente estables en el intervalo de 0-4°C. Durante el almacenaje, cuando la actividad catalítica no es importante, ese sería el rango ideal de temperatura. En algunos casos la presencia de estabilizantes, e.g. glicoles y compuestos sulfhídrico, ha demostrado ser altamente beneficiosa. La presencia de reactivos o análogos de reactivo ha demostrado también tener un efecto estabilizante sobre muchas enzimas. Se cree que esto es el resultado de cambios conformacionales que conducen a una mayor rigidez de la estructura después del ligamento. Otros agentes que muestran tener efectos estabilizantes son los polímeros orgánicos, los antioxidantes y los agentes quelantes.

### **ESTABILIZACIÓN PARA LA UTILIZACIÓN**

Los métodos de abordar el problema de la estabilidad operacional pueden dividirse en cinco categorías:

- 1) Búsqueda de enzimas estables en la naturaleza.
- 2) Adición de estabilizantes.
- 3) Modificación química.
- 4) Inmovilización.
- 5) Ingeniería de las proteínas.

Intrínsecamente, las enzimas estables se encuentran generalmente en organismos adaptados a vivir en condiciones hostiles. Actualmente, hay un gran interés en las enzimas de organismos adaptados a vivir en fuentes termales (Termófilos) y medios altamente salinos (halófilos), y se han realizado gran cantidad de estudios sobre la relación estructura-estabilidad de las enzimas procedentes de organismos termófilos.

El uso de aditivos estabilizantes debe ser cuidadosamente considerado con respecto a los costos de operación. Sin embargo, en muchos casos la concentración de reactivo puede influir significativamente en la estabilidad enzimática, y de esta manera, la concentración de reactivo operacional elegida puede restringir la elección de las condiciones y la configuración del reactor. La utilización de las bajas concentraciones de agentes quelantes ejemplo EDTA, inhibidores del crecimiento microbiano (azidas), y protectores de tioles (sulfuro de hidrógeno) pueden ser beneficiosas, aunque en muchos casos estos aditivos sean inaceptables por razones de salud y seguridad. (15)

La modificación química de enzimas comprende la acilación, alquilación, reacciones con derivados de aminoácidos y otros sustituyentes diversos. Esta es una área complicada donde es difícil predecir efectos sobre una base a priori. De nuevo en este aspecto se debe sopesar el costo de la modificación con las ventajas. (15)

Las enzimas inmovilizadas pueden presentar mayor estabilidad como resultado del acoplamiento a un soporte insoluble, aunque esto no puede darse por sentado. En la práctica, es posible mejorar la estabilidad por *co-inmovilización de residuos químicos específicos* (ejemplo grupos sulfhidrilo, albumina) con la enzima. La protección frente a la acción de enzimas proteolíticas y la degradación microbiana puede llevarse a cabo utilizando métodos de atrapamiento.

La ingeniería proteica es la aproximación más reciente al mejoramiento de la estabilidad enzimática. Los métodos utilizados se derivan de los avances en técnicas de ingeniería genética y de gráficos de computadora unidos a un mayor conocimiento de la estructura proteica. (8,15,37)

### **2.6.3. INMOVILIZACIÓN**

Considerando las propiedades de las enzimas, es también importante examinar las implicaciones de cualquier modificación hecha en la estructura enzimática. Desde el punto de vista de un proceso, puede ser deseable «inmovilizar» la enzima para permitir su retención en un reactor. Esta inmovilización está dirigida a inducir cambios en las propiedades observadas. El tipo y la magnitud de estos cambios dependerá de la enzima y del método de inmovilización utilizado. (15)

A partir de 1972 surgió toda una serie de metodologías que condujeron a hacer una clasificación de los métodos de inmovilización que son:

- a) Adsorción.
- b) Unión covalente.
- c) Microencapsulación.
- d) Reticulación o Encapsulación.
- e) Entrecruzamiento.

En este manual se suministrará una breve descripción de los principales tipos de inmovilización (fig.6.1). Aclarando que para un análisis más detallado, el lector debe remitirse a Trevan (1980). (42)

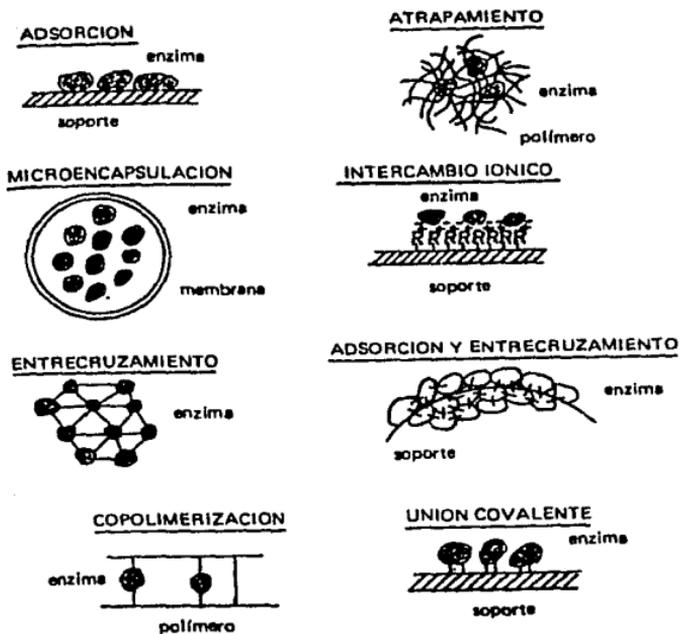


Figura 6.1 Representación esquemática de los métodos empleados para la inmovilización de enzimas. (37)

### **Adsorción**

Las enzimas pueden ser adsorbidas sobre la superficie de un soporte. Este proceso de interacciones físicas más que químicas (efectos de carga e interacciones hidrofóbicas), y la flexibilidad de este tipo de inmovilización, reduce al mínimo las posibilidades de distorsión estructural de la enzima. Se considera que la adsorción es análoga a lo que ocurre en las enzimas unidas a membranas in vivo. La naturaleza de las interacciones es tal, que la adsorción es generalmente un proceso reversible, y cambios en las condiciones del proceso, pH y fuerza iónica, pueden causar desorción. A pesar de este inconveniente la adsorción ha sido utilizada para algunos procesos industriales (la glucosa isómerasa en DEAE-celulosa se ha utilizado comercialmente). (8,15,37,46)

### **Unión Covalente**

La unión covalente de enzimas solubles a un soporte insoluble es el método más común para la inmovilización de enzimas habiéndose utilizado una amplia gama de técnicas y soportes para este propósito. Aunque parte de la actividad pueda perderse durante el proceso de acoplamiento es improbable la lixiviación (separación) de la enzima del material catalítico. (8,15,37,46)

### **Atrapamiento**

En este caso la enzima permanece en un estado sin modificar, pero es atrapada en una gotita de disolvente dentro de una matriz polimérica. En caso de atrapamiento la enzima será dispersada por todas las partes de una preparación polimérica como poliacrilamida. (15)

### **RETICULACIÓN o ENCAPSULAMIENTO**

Para la reticulación o encapsulamiento se lleva a cabo una aproximación más controlada y la enzima es atrapada en pequeñas cápsulas. Un método que ha sido utilizado es la polimerización interfacial de una membrana de nylon alrededor de una gotita que contenga a la enzima. Los inconvenientes de estas aproximaciones son los efectos del polímero sobre la disponibilidad del reactivo. Esto impide la utilización de enzimas atrapadas con reactivos de alto peso molecular. Sin embargo, parece que el polímero protege a la enzima bajo alguna circunstancia. (1,12,46)

### **ENTRECruzamiento**

Se han polimerizado enzimas por entrecruzamiento con agentes bifuncionales tales como benzidina, disotiocinatos, glutaraldehído, etc. En general, el producto es gelatinoso y no se puede manejar con facilidad. (37)

Aunque han sido estudiados otros métodos de inmovilización (membranas ultrafiltrantes), la adsorción y la unión covalente representan las principales metodologías. Revisiones más detalladas de los métodos de inmovilización han sido presentadas por otros autores. (30,36)

### **EFFECTOS DE LA INMOVILIZACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

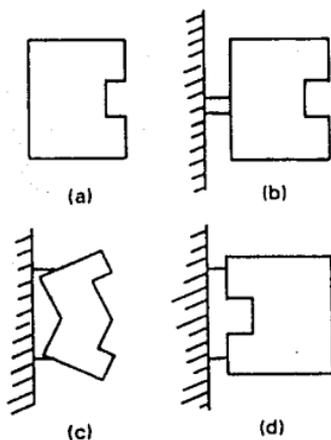
Cuando una enzima es inmovilizada la actividad de la preparación es siempre diferente a la de la forma natural. Las razones para ello son muchas pero es posible identificar las tres principales influencias, a saber, efectos conformacionales de partición y difusionales. (16)

La inmovilización puede causar perturbaciones estructurales en la proteína, reduciendo la eficacia catalítica de la enzima. Además, la inmovilización puede limitar el acceso del reactivo al centro activo de la enzima, reduciendo nuevamente la actividad. Ambos fenómenos pueden ser descritos como efectos conformacionales.

Los efectos de partición ocurren cuando las concentraciones de reactivo o de otros compuestos relacionados con la actividad de la enzima pueden ser diferentes en la superficie del soporte matriz de las observadas en el grueso de la solución. Estos efectos pueden surgir por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, y dependiendo de el(los) componente(s) implicado(s), los efectos de partición pueden intensificar o rebajar la velocidad de la reacción observada.

Los efectos difusionales o de transferencia de masa pueden ser de dos tipos internos o externos (19). La resistencia externa proviene de la presencia de una película de líquido inmóvil alrededor de la partícula de enzima inmovilizada. La resistencia interna a la transferencia de masa surge cuando las enzimas quedan atrapadas en polímeros.

Los cambios conformacionales son más difíciles de evaluar y no han sido tan bien descritos como los efectos de partición y de transferencia de masa. Además los efectos conformacionales variarán con la enzima, el método de acoplamiento y el soporte utilizado. Algunas de las consecuencias adversas de la inmovilización sobre la actividad enzimática son ilustradas en la figura 6.2.



*Figura 6.2*

Consecuencias de la inmovilización de enzimas:  
(a) enzima libre; (b) enzima activa inmovilizada;  
(c) enzima inactiva inmovilizada (cambio conformacional); (d) enzima inactiva inmovilizada (impedimento estérico). (15)

Una de las implicaciones más significativas de los efectos de partición es la capacidad para controlar el pH en la proximidad de la enzima independientemente del pH del grueso de la solución. Si una enzima es inmovilizada en un soporte cargado e.g. una resina cambiadora de iones, la diferencia en las concentraciones de los componentes cargados entre la superficie y la fase mayoritaria puede ser descrita por coeficiente de partición (P).

$$P = C_s/C_b \quad (1)$$

Donde:

$C_s$  = concentración en la superficie

$C_b$  = concentración en el grueso de la solución

En el caso de iones  $H^+$ , estos efectos han sido correlacionados con una distribución tipo *Boltzmann*.

$$H_s^+ = H_b^+ \exp(-e\phi /KT) \quad (2)$$

Donde:

$H_s^+$  = concentración de ion hidrógeno en la superficie

$H_b^+$  = concentración de ion hidrógeno en el grueso de la solución.

$e$  = carga electrónica

$\phi$  = potencia electrónica

$K$  = constante Boltzmann

$T$  = temperatura absoluta

Esto puede ser expresado en términos de un coeficiente de partición dividiendo por  $Hb^+$

$$PH^+ = \exp(e\phi /KT) \quad (3)$$

El cambio del pH puede calcularse a partir de la ecuación (2) dividiendo por  $Hb^+$  y tomando logaritmos en ambos lados.

$$\ln\{Hs^+/Hb\} = (-e\phi /KT)$$

$$2.303 \log\{Hs^+/Hb\} = (e\phi /KT)$$

$$pH = 0.43 (e\phi /KT)$$

Los efectos de resistencia externa de transferencia de masa pueden ser representados considerando un gradiente lineal de concentraciones de reactivo a través de la capa limitante inmóvil. Esto conduce a unos valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  modificados.

$$-d[S]/dt = (V_{m\acute{a}x}[S])/([S] + K_m)$$

Donde:

$V_{m\acute{a}x}$  = velocidad máxima observada

$[S]$  = concentración del sustrato

$$K'm = v_{\text{máx}}\sigma/D_s$$

Donde:

$D_s$  = difusividad del reactivo

$\sigma$  = espesor de la capa límite

Como el espesor de la capa limitante es un concepto abstracto del modelo y carece de significado físico, se expresa generalmente en términos de una resistencia de transferencia de masa ( $K_s$ )

$$K_s = D_s/\sigma$$

Esto puede ser calculado a partir del número de *Sherwood* ( $Sh$ )

$$Sh = K_s d_p / D_s$$

Donde:

$d_p$  = diámetro de la partícula.

El número de *Sherwood* puede también ser calculado utilizando correlaciones con la dinámica del fluido del sistema.

$$Sh = c Re^a Sc^b$$

Donde:

$a$ ,  $b$  y  $c$  son constantes, cuyos valores dependen del valor del número de Reynolds ( $Re$ )

$Sc$  = Número de Schmidt

Para valores del número de Reynolds ( $20 < Re < 120$ ), pueden utilizarse las siguientes constantes,  $a = b = 0.33$  y  $c = 4.6$ .

Los números de Reynolds se definen de acuerdo al tipo de reactor. Así, para lechos fijos

$$Re = (vd\rho)/\mu$$

y para recipientes con agitación

$$Re_i = [(nd_i)d_i\rho]/\mu$$

Donde:

$d_i$  = diámetro del impulsor

$v$  = velocidad del líquido

$d_p$  = diámetro de la partícula

$\rho$  = densidad del líquido

$\mu$  = viscosidad dinámica

$n$  = velocidad del agitador

El número de *Schmidt* es la razón de la difusividad frente a la viscosidad.

$$Sc = Ds\rho/\mu$$

Así, el número de *Sherwood* puede ser calculado para las condiciones experimentales utilizadas, y resuelto para la proporción de transferencia de masa. Esto puede ser utilizado junto con la  $V_{m\acute{a}x}$  medida para cuantificar la expresión cinética. (15,46)

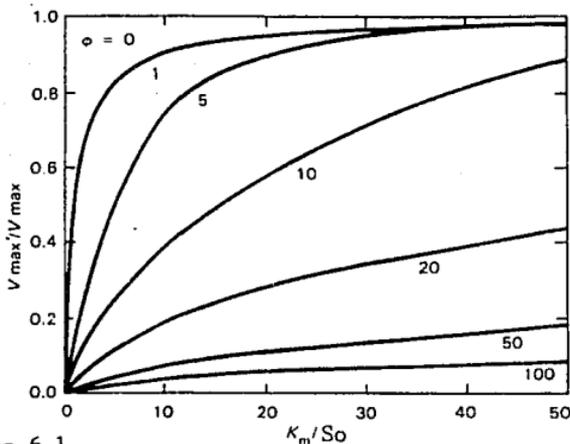
El efecto de la transferencia de masa interna sobre la velocidad de reacción observada resulta nuevamente de una reducción en la concentración de sustrato disponible. En la práctica, los efectos de transferencia de masa interna usualmente son calculados utilizando gráficos (gráfica 6.1) generalizados del factor de eficacia, donde la razón  $V_{m\acute{a}x}$  (observada)/ $V_{m\acute{a}x}$  (teórica) frente a  $K_m/[S_0]$ , en donde ( $S_0$ ) es la concentración de sustrato que penetra en el reactor, para diferentes valores del módulo de Thiele ( $\emptyset$ ) adimensional. El módulo de Thiele es de la forma

$$\emptyset = L \sqrt{(V_{m\acute{a}x})/(K_m D_c)}$$

Donde:

$L$  = espesor medio de la partícula para la transferencia limitada de masa externa de la enzima inmovilizada

$D_c$  = difusividad del reactivo a través de la matriz de inmovilización.



Gráfica 6.1

El gráfico del módulo de Thiele para la resistencia interna a la transferencia de masa. Los gráficos de la velocidad global de reacción en una membrana enzimática,  $V_{max}$ , normalizada a  $V_{max}$ , frente a la concentración adimensional de sustrato en la superficie,  $K_m/S_0$  para diferentes valores del módulo de Thiele,  $\phi$ . El efecto de las limitaciones de difusión aumenta con valores crecientes de  $\phi$ , y produce un descenso de la velocidad controlada cinéticamente, la cual se obtiene para  $\phi = 0$ .

(Tomado de Horvath y Engasser, 1974)

Las implicaciones de la transferencia de masa interna sobre la enzima cargada sugieren que debe haber un compromiso entre una preparación altamente activa que muestre un factor de efectividad baja y una preparación de baja actividad que muestra un factor de efectividad alto.

Aunque la transferencia de masa interna sea generalmente, indeseable, ya que conduce a una disminución de la concentración efectiva de reactivo, se ha visto que en sistemas que muestran inhibición de reactivo, puede ofrecer alguna ventaja. (5)

#### **EFFECTOS DE LA INMOVILIZACIÓN SOBRE LA ESTABILIDAD**

El incremento de la estabilidad es a menudo citado como una ventaja de la inmovilización enzimática. De un examen superficial de la literatura relativa en enzimas inmovilizadas, es fácil concluir que la inmovilización conduce casi invariablemente a la estabilización. Sin embargo, se ha sugerido que los ejemplos de estabilización son los preferentemente narrados y pueden conducir a una imagen deformada de la verdadera situación. (15)

Aunque es imposible deducir expresión matemática para el efecto de la inmovilización sobre la estabilidad, pueden verse ciertas tendencias. En el caso de enzimas proteolíticas se observa a menudo un efecto estabilizante, pudiendo ser atribuido generalmente a una reducción en el grado de autólisis. (18) Pero esto no es una generalidad, se ha comprobado que hay enzimas que al ser inmovilizadas no aumentan su estabilidad y hay otras que su estabilidad baja cuando son inmovilizadas. Por lo dicho anteriormente concluimos que la estabilidad de una enzima inmovilizada no puede ser determinada «apriori». La complejidad global de los factores que

afectan a la estabilidad enzimática sugiere que, en el presente, la única aproximación factible es el obtener datos experimentales bajo las condiciones a utilizar en el proceso de producción. (17)

## NOMENCLATURA

Símbolo	Interpretación	Unidades
a,b,c,	Constantes	
Cb	Concentración en la solución	Kgmol m <sup>-3</sup>
Cs	Concentración en la superficie	Kgmol m <sup>-3</sup>
di	Diámetro del impulsor	m
dp	Diámetro de la partícula	m
Dc	Difusividad del sólido a través de la matriz de inmovilización	
Ds	Difusividad del sólido en la solución	mS <sup>-1</sup>
e	Carga electrónica	
E	Concentración de enzima activa	Kgmol m <sup>-3</sup>
Eo	Concentración de enzima activa en el tiempo cero	Kgmol m <sup>-3</sup>
Et	Concentración de enzima activa en el tiempo t	Kgmol m <sup>-3</sup>
Hb <sup>+</sup>	Concentración de ion hidrógeno en la solución	Kgmol m <sup>-3</sup>
Ha <sup>+</sup>	Concentración de ion hidrógeno en l superficie	Kgmola m <sup>-3</sup>
K	Constante de Boltzmann	
Kd	Velocidad de desaparición de la enzima	S <sup>-1</sup>
Km	Constante de Michaelis	Kgmol m <sup>-3</sup>
Ks	Coefficiente de transferencia de masa	ms <sup>-1</sup>
L	Espesor de la partícula	m
P	Coefficiente de participación	
Re	Número de Reynolds	
Sh	Número de Sherwood	
Sc	Número de Schmidt	
t	Tiempo	S
T	Temperatura absoluta	
Vmáx	Velocidad máxima	Kgmol m <sup>-3</sup>
σ	Espesor de la capa limitante	m
φ	Potencial electrónico	Volts
ρ	Densidad	Kg m <sup>-3</sup>
μ	Viscosidad	mS <sup>-1</sup>
Ø	Modulo de Thiele	

## 2.7 UNIDAD VII

### SENSORES BASADOS EN ENZIMAS

#### INTRODUCCIÓN

Una de las primeras áreas de aplicación de las enzimas fue en el campo del análisis. Muchos compuestos no pueden ser determinados directamente y por lo tanto es necesario convertirlos a otros productos cuyos niveles sí pueden ser cuantificados. El análisis enzimático se ha venido empleando durante muchos años, y la tendencia va en aumento, como consecuencia de la mayor disponibilidad de enzimas altamente purificadas. Hoy día existe un manual completo de análisis enzimático editado por Bergmeyer. (5)

A continuación se hablará a grandes rasgos de los principales sensores basados en enzimas que existen.

#### 2.7.1. ENZIMAS INMOVILIZADAS

Los progresos en las técnicas de inmovilización de enzimas han realizado una contribución significativa al campo de los sensores enzimáticos. Las ventajas de las enzimas inmovilizadas en el análisis se pueden resumir como sigue:(6)

- 1) Mayor estabilidad
- 2) El catalizador reutilizable
- 3) La muestra se puede separar de la enzima para análisis posteriores
- 4) Curvas de inactivación predecibles.

El uso de enzimas inmovilizadas en los sistemas analíticos se puede dividir en dos grupos. Primero, se puede construir un reactor enzimático que produzca uno o más productos detectables por métodos estándar (por ejemplo, por cambios de absorbancia). En segundo lugar, se puede inmovilizar la enzima alrededor o sobre un transductor que es capaz de detectar los cambios físicos o químicos en su entorno inmediato. (15)

### **2.7.2 REACTORES ANALÍTICOS**

Estos reactores pueden considerarse como ejemplos de análisis por inyección en flujo. Básicamente el sistema es similar a la cromatografía líquida pero sin etapa de separación. (figura 7.1) (34)

Estos reactores pueden ser normalmente de dos tipos:

#### **(I) REACTOR DE LECHO EMPAQUETADO**

La enzima se inmoviliza en un soporte particulado que se empaqueta en una columna. El líquido conteniendo la muestra, se hace pasar a través de la columna, permitiendo que tenga lugar la reacción. La ventaja de este sistema es que existe una gran área para la inmovilización, por lo que es posible una gran carga de enzima. El inconveniente de este tipo de reactor, es que causa la dilución de la muestra/producto, y por lo tanto, tiende a reducir la sensibilidad del ensayo. Por lo tanto, podemos decir que mientras los sistemas de lecho empaquetado ofrecen una mayor actividad para la monitorización continua, tiene algunos inconvenientes para ensayos que tienen que realizarse sobre un gran número de muestras discretas. (15)

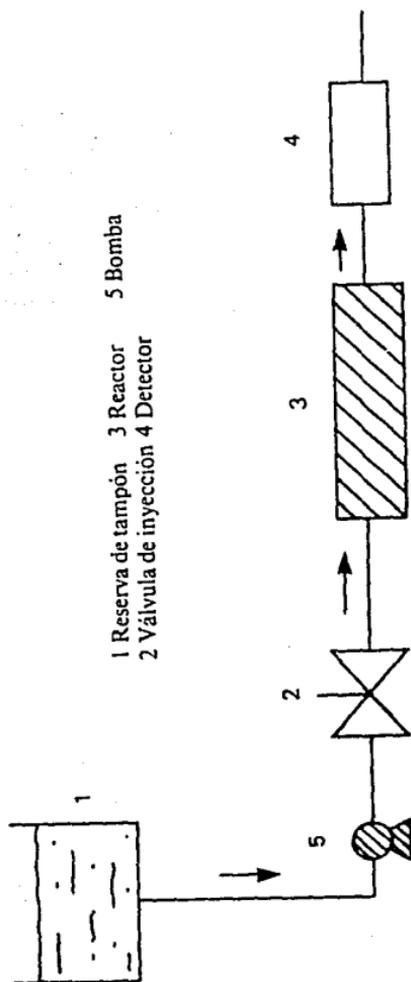


Figura 7.1 Esquema de un aparato para análisis por inyección en flujo. (15)

## **(II) REACTORES TUBULARES ABIERTOS.**

La enzima se inmoviliza en el interior de una porción de tubo, típicamente con un diámetro interno de mm. La muestra se pasa entonces a través de esta porción de tubo, que sirve como reactor. La desventaja es que hay una área relativamente pequeña para la inmovilización, siempre que la longitud del tubo se mantenga en límites razonables ( $< 10$  mm). Aunque la escasa superficie es un problema potencial, los estudios sobre reactores tubulares de nylon han mostrado que éste es compensado por la mayor tasa de transferencia de masa obtenida con los reactores tubulares.

Los reactores enzimáticos analíticos se han venido usando en una amplia gama de determinaciones desde 1976 en los EE.UU. (15)

### **2.7.3. ENZIMAS LIGADAS A TRANSDUCTORES**

Aunque ampliamente utilizados, los analizadores basados en reactores enzimáticos son aparatos complejos y costosos. Una alternativa consiste en combinar la enzima con el detector para simplificar la operación. El objetivo es producir un sensor robusto y barato capaz de dar salida continua. En el caso ideal tal sensor no requeriría reactantes internos distintos a los sustratos y sería tan poco destructivo como fuera posible, esto es, afectando sólo a una pequeña fracción del sustrato.

La forma más sencilla de un sensor enzima-transductor es el denominado electrodo enzimático (fig 7.2). En este caso la enzima se une a un electrodo ion-selectivo que detectará la presencia del sustrato o del producto de la reacción enzimática. Un ejemplo de esta aproximación sería la asociación de ureasa con una sonda de amonio, de tal

forma, que la concentración de una solución de urea puede determinarse a partir del amonio liberado al hidrolizarse la urea.(11)

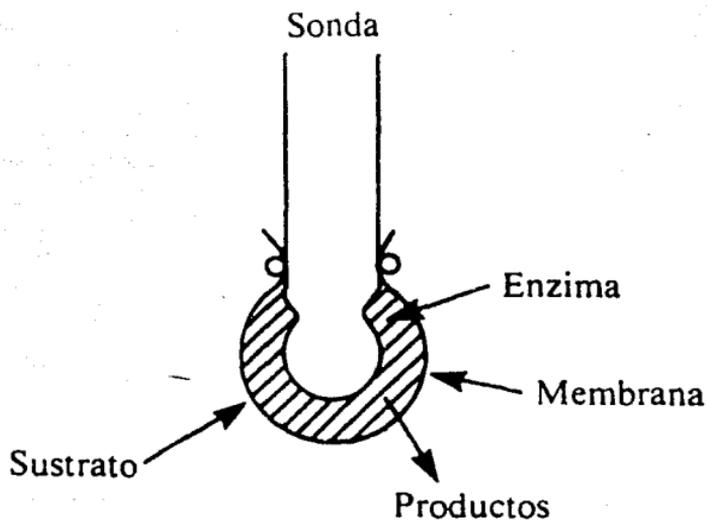
Un gran número de electrodos enzimáticos se han basado en un electrodo de oxígeno combinado con reacciones redox enzimáticas. Un ejemplo de ello, es la detección de glucosa con la enzima glucosa-oxidasa. (15)

Las sondas sensoras empleadas en los electrodos enzimáticos son de dos tipos: potenciométricas y amperiométricas. Las sondas potenciométricas por ejemplo el electrodo de vidrio-pH, determina el potencial entre un electrodo de referencia y el electrodo sensor ( figura 7.3) (44)

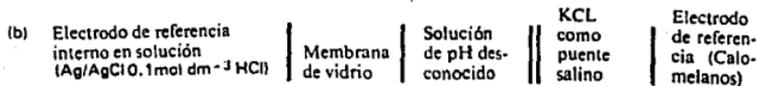
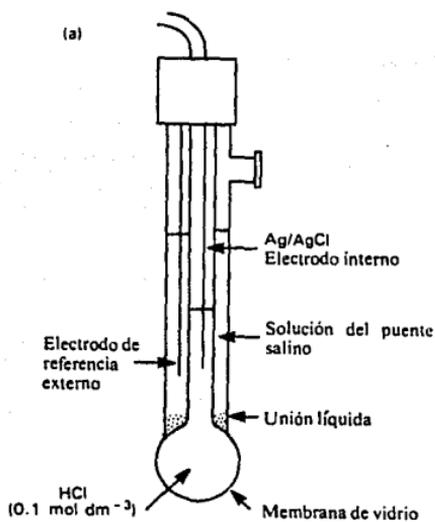
El sistema constituye una célula eléctrica donde el potencial observado es la suma de tres componentes:

- 1) El electrodo de referencia interno
- 2) El potencial de asimetría
- 3) El potencial debido a la diferente concentración de iones hidrógeno a ambos lados de la membrana.

Los dos primeros componentes son constantes para cada electrodo, dejando la concentración de iones hidrógeno como una variable, que se cree que resulta bien de la transferencia de hidrogeniones a través del vidrio, o bien de un proceso de cambio iónico. La segunda categoría de electrodos es la de tipo amperométrico. El ejemplo más común de esta clase de sonda es el electrodo de oxígeno de *Clark*. Está basado en un cátodo de platino y un ánodo de plata sumergidos en la misma solución del cloruro potásico, pero separados de la solución problema por una membrana de poli-tetra-fluoroetileno (PTFE).



**Figura 7.2** Un electrodo enzimático sencillo.(15)

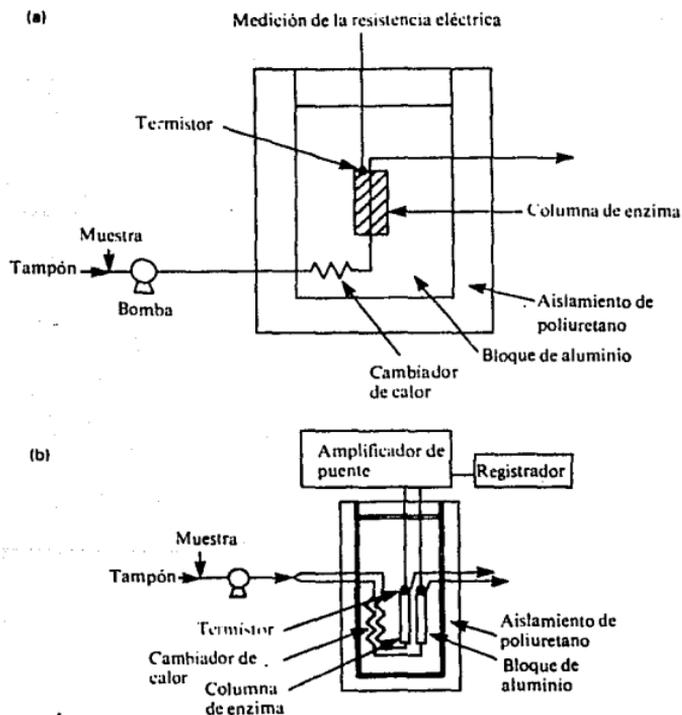


**Figura 7.3** (a) Estructura de una sonda de pH combinada. (b) Reacciones de semicélula en una sonda combinada. (15)

Aunque las sondas enzimáticas se han empleado con éxito, es necesario decir que su desarrollo ha sido ensombresido por los avances de otras áreas de desarrollo de sensores. Su principal ventaja radica en su naturaleza relativamente robusta, facilidad de fabricación y simplicidad del equipo asociado. (15,46)

#### **2.7.4. TERMISTORES ENZIMÁTICOS**

Esta técnica se ha desarrollado a partir de la investigación en microcalorimetría. Los primeros sistemas eran análogos al reactor enzimático discutido previamente. En este caso, una reacción exotérmica es catalizada por una enzima inmovilizada y el calor desarrollado se determina midiendo el cambio de temperatura del fluido de reacción. Estos sensores eran muy sensibles pero tenían una respuesta lenta. El desarrollo de los termistores basados en materiales semiconductores que presentan un gran cambio de resistencia al variar la temperatura ha permitido la miniaturización de microcalorímetros basados en enzimas y ha conducido al concepto de termistor enzimático. (31) En estos aparatos se construye una columna de enzima inmovilizada bien aislada y se monta un transmisor en el centro del material de empaquetamiento de la columna. Este transductor es sensible a cambios de temperatura extremadamente pequeños que se reflejan en cambios de impedancia. Normalmente se obtienen cambios entre  $0.004^{\circ}\text{C}$  y  $1.0^{\circ}\text{C}$ ; que caen dentro del rango de sensibilidad del detector. Los diseños típicos del comportamiento del sensor se pueden ver en la figura 7.4, que se muestra tanto un instrumento sencillo de termistor único, como un sistema que emplea un termistor de referencia. El mayor problema experimental asociado con el uso de termistores enzimáticos es la necesidad de minimizar las fluctuaciones de la temperatura externa. El empleo de baños de agua y recubrimientos aislantes es frecuentemente suficiente para evitar este problema.



**Figura 7.4** (a) Disposición de un termistor enzimático usando un único termistor sensor. (b) Esquema de un sistema de doble termistor.  
(Tomado de Mosbach y Daniels, 1981).

La respuesta de un termistor a un cambio de temperatura se puede describir por

$$R_2 = R_1 \exp(B/T_2 - B/T_1)$$

Donde:

B = constante característica de temperatura

T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> = temperatura del termistor

R<sub>1</sub> = resistencia del termistor a T<sub>1</sub>

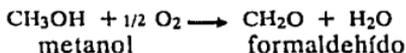
R<sub>2</sub> = resistencia del termistor a T<sub>2</sub>

Por lo tanto, el cambio de temperatura del termistor se puede calcular de su cambio de resistencia.

Se han hecho muchos intentos de usar termisores enzimáticos, pero uno de los usos que más éxito ha tenido; es todo un sistema que usa un termistor enzimático para detectar los cambios en la concentración del afluente y controlar la bomba de alimentación en un reactor de enzima inmovilizada para la hidrólisis de lactosa a D-glucosa y D-galactosa. (12)

### **2.7.5. INTERACCIONES DIRECTAS DE ENZIMA-ELECTRODO**

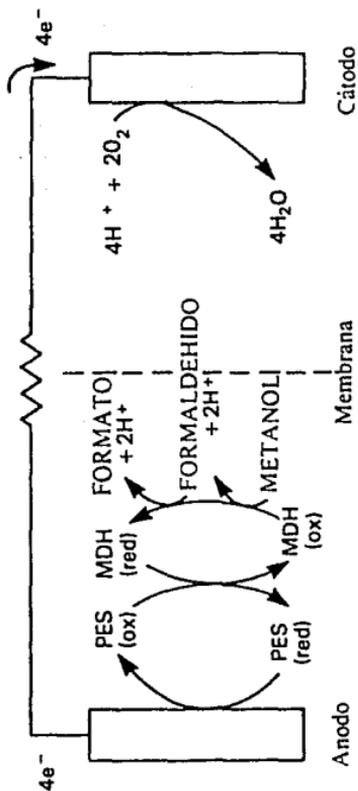
Las interacciones directas enzima-electrodo surgen del concepto de célula de combustible. En este sistema la oxidación enzimática de un compuesto se emplea en generar flujo de electrones por un circuito externo. Un ejemplo sencillo es la oxidación del metanol a formaldehído usando metanol-deshidrogenasa. (35) La estequiometría de la reacción se puede escribir como:



La organización de una célula de combustible (figura 7.5) incluye una membrana de cambio iónico para separar los dos compartimientos. En la práctica, la transferencia directa de electrones de la enzima al electrodo todavía no se ha logrado, por lo que es necesario un mediador. Este mediador es usualmente un colorante redox que puede ser reducido por la enzima y oxidado en el electrodo. Un mediador muy común es el colorante etanosulfonato (PES).

Es importante mencionar, que aunque no se espera que las células combustible ofrezcan una posibilidad real de producción de energía en un futuro próximo, pueden ofrecer algunas soluciones a problemas específicos (por ejemplo, para impulsar in vivo los marcapasos cardíacos) y en algunas aplicaciones militares, particularmente en la alimentación de dispositivos de comunicaciones.

Los desarrollos futuros se espera que permitan el acoplamiento directo de la enzima al electrodo, eliminando de este modo la necesidad de un compuesto mediador. Este concepto es fundamental para el desarrollo de "biochips". (43)



**Figura 7.5** Ejemplo de una célula de combustible bioelectroquímica sencilla basada en metanol deshidrogenasa (MDH). (Tomado de Plotkin *et al.*, 1981)

### 2.7.6. OTROS DISPOSITIVOS SENSORES

Además de los sensores mencionados anteriormente, se ha logrado la creación de algunos otros dispositivos que funcionan como sensores, los cuales, se mencionaran a continuación:

Se ha logrado la determinación de albúmina sérica humana (HSA) empleando un electrodo de afinidad. Se construyeron dos electrodos idénticos de dióxido de titanio y uno de ellos se modifico por la adición del tinte textil reactivo Cibacrom Blue F36-1A (28). Este tinte tiene una alta afinidad por la HSA y se puede emplear en separaciones por afinidad.

Otra aproximación a la detección biológica es el sensor opto-electrónico: el cambio en la concentración de un componente provoca el cambio de color de un tinte. Emplazando la cámara de reacción entre un diodo emisor de luz y una fotocélula, la concentración se puede determinar a partir del cambio de absorbancia.

Es evidente que existe cierto número de estrategias empleables en el desarrollo de sensores basados en enzimas (23). Sin embargo, las vías de desarrollo de biosensores discutidas en esta unidad no son necesariamente excluyentes. Mientras que la facilidad potencial con que pueden integrarse los sensores bio-electroquímicos con los circuitos de monitorización, los hace muy atractivos, no son adecuados para todos los reactivos, siendo esto la principal limitante para el desarrollo a gran escala de estos biosensores. (15)

## 2.8 UNIDAD VIII

### APROXIMACIONES A LA MODIFICACIÓN DE ENZIMAS

#### INTRODUCCIÓN

Se considera normalmente que las propiedades y especificidad de las enzimas han ido evolucionando conforme lo han hecho sus organismos hospedadores. Sin embargo sería posible mejorar ciertas propiedades de las enzimas con la finalidad de obtener aun más ventajas de ellas. Por ejemplo, puede resultar ventajoso aumentar la estabilidad al calor o alterar el pH óptimo de una enzima, y con ello, mejorar la eficiencia de un proceso definido. Alternativamente, puede resultar conveniente aumentar la actividad de la enzima hacia un sustrato particular.

Se han desarrollado numerosos métodos para la modificación de enzimas, que van desde los más simples hasta los más complejos. El objetivo de esta unidad es describir algunas de las diferentes aproximaciones experimentales que se han seguido para mejorar el funcionamiento de las enzimas y evaluar el potencial de estos métodos (15)

#### 2.8.1. SELECCIÓN DE LA FUENTE APROPIADA

Inicialmente, y antes de pensar en un procedimiento de modificación de una enzima, vale la pena considerar si la fuente de dicha enzima es la más adecuada. A menudo, se pueden encontrar enzimas que catalizan la misma reacción en organismos diferentes; por ejemplo, se pueden aislar  $\alpha$ -amilasa de animales, plantas o microorganismos y cada una presenta diferentes propiedades, particularmente con

respecto a su termoestabilidad. Esta termoestabilidad es importante para el proceso de hidrólisis enzimática del almidón que es donde interviene la  $\alpha$ -amilasa. Con las enzimas menos estables la hidrólisis parcial tiene lugar en estadios separados en el proceso global, cosa que lo hace ineficiente, a diferencia de usar  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus, licheniformis*, con la cual, debido a su termoestabilidad elevada se logra la hidrólisis en un solo paso. Por tanto, en algunos casos es posible mejorar significativamente un proceso sin necesidad de modificar las enzimas en absoluto. Por otro lado, la selección de la fuente más adecuada de una enzima puede ser solamente un requisito para los procedimientos de modificación (8,15)

### 2.8.2. SUSTITUCIÓN DE IONES METÁLICOS UNIDOS

Muchas enzimas contienen iones metálicos unidos que son esenciales para su actividad. Considerando que la eliminación del ion metálico conduce a una pérdida total de actividad, es posible, a menudo, la sustitución por otro catión, con interesantes resultados. Un ejemplo particularmente ilustrativo de este fenómeno lo muestran las *D-glucosa isomerasas*.

La glucosa isómera de la bacteria *Bacillus Coagulans* cepa HN-88 tiene interesantes propiedades en presencia de diferentes iones metálicos, que son aplicables a la mayoría de enzimas de este grupo. En ausencia de iones metálicos añadidos, la enzima purificada muestra una especificidad de sustrato para D-xilosa, sin actividad hacia D-glucosa o D-ribosa. La adición de  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  10 mM aumenta la actividad absoluta de la enzima, y aunque la D-xilosa es todavía el sustrato preferente, se produce algo de isomerización de D-glucosa y D-ribosa. Si se utiliza  $\text{Cl}_2\text{Co}$  10 mM en lugar de la sal de Mn, entonces la especificidad de la enzima para el sustrato se altera totalmente. D-glucosa y D-ribosa son ahora los sustratos presentes y la actividad hacia D-xilosa es relativamente menor. La adición de agentes quelantes de iones metálicos como EDTA elimina totalmente la actividad

hacia los tres sustratos potenciales. El efecto del catión es causar un cambio conformacional en la estructura proteica que resulta en una alteración de la unión específica del sustrato. Por tanto, incluso técnicas relativamente simples, tales como la sustitución de un cofactor metálico por otro, pueden ejercer profundos cambios en la especificidad del enzima por el sustrato. (8,15)

### **2.8.3. MODIFICACIÓN COVALENTE DE ENZIMAS**

La modificación química de proteínas se ha utilizado ampliamente como una herramienta para dilucidar el mecanismo de acción de las enzimas. Sin embargo, la modificación química también puede emplearse para cambiar las propiedades físicas, la especificidad por un sustrato o incluso el tipo de reacción catalizada por una enzima particular, y son algunos de estos aspectos los que van a ser ampliados aquí. La inmovilización de enzimas, por cualquier método, debería también ser considerada como un medio de alterar ciertas propiedades enzimáticas, pero como este aspecto de la modificación de enzimas se ha tratado ya con anterioridad no va a ser considerado en esta unidad.

#### **MODIFICACIÓN QUÍMICA DE AMINOACIDOS ESPECÍFICOS**

Este método de basa en el principio de que las modificaciones covalente de un AMINOACIDO. específico alterará las propiedades catalíticas o de unión específica de una enzima (23). Para interpretar correctamente estos experimentos se requiere un conocimiento íntimo de la estructura de la proteína bajo estudio, y por esta razón la mayor parte de los trabajos realizados se han centrado en proteasas bien caracterizadas. Normalmente se han realizado intentos para alterar el pH óptimo o la especificidad por el sustrato de una enzima, y son ejemplos de estas clases de modificaciones los que se van a describir a continuación.

La papaína es una cisteín-proteasa que requiere de un grupo tiol reducido en el centro activo y residuos triptófano no funcionales. La modificación de la papaína con hidroxietil-disulfuro para proteger los grupos sulfhídrido, seguida de la reacción con N-bromosuccinamida, produce oxidación de uno de los cinco residuos triptófano disponibles (Trp-67 o ambos Trp-67 y Trp-177). Solamente la modificación de Trp-67 produce una enzima modificada que tiene el mismo valor de  $pK_a$  para la dependencia del pH de la  $K_{cat}$  y de la razón  $K_{cat}/K_m$  que la papaína nativa. Sin embargo, la oxidación de los residuos Trp-67 y Trp-177 produce un aumento de aproximadamente una unidad para los valores de  $pK_a$  de ambas  $K_{cat}$  y  $K_{cat}/K_m$ . Se ha postulado que la modificación del Trp-177 puede producir un cambio en la hidrofobicidad del centro activo de la papaína, con resultado de un efecto de pH en las constantes cinéticas.

Es posible la modificación selectiva de aminoácidos para alterar la actividad catalítica relativa de una proteasa hacia proteínas y sustratos ésteres de peso molecular pequeño. Por ejemplo, la modificación de la subtilisina Carlsberg, una Serin-proteasa, con tetranitrometano, produce la nitrógenación de un único aminoácido Tyr-104. Esto conlleva un aumento de 6 veces la actividad proteolítica hacia sustratos macromoleculares cargados positivamente (clupeína), pero no aumenta la degradación de proteínas neutras (caseína). Sin embargo, y sorprendentemente, no se observa diferencia en las velocidades relativas de hidrólisis de los ésteres, éster metílico de p-tolueno sulfonil-L-arginina (cargado positivamente) ni éster etílico de benzoiltirosina (sustrato neutro).

Si bien la modificación química de AMINOACIDOS, específicos puede producir efectos profundos en la actividad de las enzimas, la técnica es bastante limitada. La mayoría de los agentes de modificación no son absolutamente específicos

para ciertos aminoácidos y es difícil, a menudo, limitar la extensión de la reacción. Consecuentemente, este método no ha encontrado amplia aplicación en un contexto industrial, si bien tiene la ventaja de su simplicidad y bajo costo. (8,15,46)

#### **2.8.4. MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ENZIMAS**

En principio es posible alterar las propiedades de una enzima por tratamiento con proteasa o glucanohidrolasas. La proteólisis limitada también puede usarse para modificar la actividad de una enzima, y es este aspecto el que se va a desarrollar aquí.

La modificación proteolítica ocurre con frecuencia «in vivo» y es a menudo un requisito para la formación de una enzima activa. Hay un ejemplo excelente del empleo de una proteasa para modificar una enzima de uso comercial. La DNA polimerasa dependiente de *Escherichia Coli* puede sintetizar DNA bajo ciertas condiciones estrechamente controladas. Paradójicamente, la misma enzima es capaz de degradar DNA y posee ambas actividades 5' 3' y 3' 5' exonucleásica. Aunque estas propiedades aparentemente en conflicto pueden reconciliarse en términos de la conocida función de la DNA polimerasa "in vivo" la actividad exonucleásica (particularmente la 5' 3'), representa una desventaja durante la síntesis de DNA polimerasa en el sentido de que no esté presente la actividad 5' 3' exonucleásica puede ser de considerable interés.

La eliminación de la actividad 5' 3' exonucleásica se puede conseguir simplemente con una proteólisis limitada de la DNA polimerasa (21). El tratamiento de esta enzima con subtilina *Carlsberg* produce la generación de dos fragmentos que pueden separarse por cromatografía de hidroxipatito. El fragmento más largo, conocido como enzima

"Klenow", posee las actividades polimerásica y 3' 5' exonucleásica, mientras que el fragmento N-terminal, más pequeño, tiene solo la actividad 5' 3' exonucleásica.

Es interesante señalar como las técnicas de manufacturación han avanzado. Varias compañías ofrecen ahora una preparación de la enzima "Klenow" que se ha elaborado con tecnología de DNA recombinante, obviando, por tanto, la necesidad de un paso proteolítico. Sin embargo y debido a la protección de patentes, la mayoría de las compañías todavía producen la enzima "Klenow", por el procedimiento tradicional. (8,15,46)

### **2.8.5. COMPLEJOS ENZIMA-COENZIMA**

La explotación comercial hasta el presente se ha restringido en su mayor parte a las hidrolasas simples, mientras que los beneficios que se podrían derivar de utilizar deshidrogenasas y quinasas para reacciones biosistémicas no se han llevado a cabo todavía. En parte, esto se debe a que el empleo de coenzimas tales como ATP y NAD<sup>+</sup> es prohibitivamente caro a menos que se disponga de algún método para regresar y reciclar estas enzimas. Se han desarrollado una serie de técnicas para la retención de coenzimas dentro de sistemas de reactores enzimáticos por inmovilización en matrices solubles e insolubles. Sin embargo, una de las ideas más excitantes es la posibilidad de unir covalentemente la coenzima al centro activo de la enzima. (23) Hay que considerar una serie de aspectos que los principales investigadores en este campo han resumido en cinco reglas para aumentar las oportunidades de éxitos.

- 1) El enzima debe estar disponible altamente purificado y en cantidad.
- 2) Se debe conocer la estructura por Rayos X de la enzima.
- 3) Debe haber un aminoácido reactivo en una cadena cercana al centro activo.
- 4) La Unión del cofactor debe causar un cambio profundo en la actividad de la enzima.
- 5) No se debe impedir el acceso de sustratos potenciales al centro activo.

El trabajo más importante en esta área ha sido el desarrollo de flavopapafna semi-sintéticas. Estas derivan de la unión covalente de análogos de flavina a la cistefna del centro activo (Cys-25) de la enzima proteolftica papafna. Como la Cys-25 es ecencial para la actividad hidrolftica normal de la papafna, una sustitución en esta posición produce incapacidad para hidrolizar protefnas. Esta propiedad resulta útil ya que la pérdida de actividad proteolftica se puede usar para monitorizar como progresa la sustitución con el cofactor, y también será más fácilmente observable cualquier nueva actividad que se pueda generar.

Las flavo-papafnas demuestran claramente que es factible el cambio total de la reacción catalizada por una enzima. En particular, el gran potencial que supone el poder utilizar protefnas obtenidas por un procedimiento fácil y barato, tales como papafnas, para generar actividades catalfticas asociadsa normalmente con enzimas más caras. Aunque las flavoprotefnas representan el ejemplo más ampliamente estudiado de enzimas semisintéticas, también se han desarrollado otros modelos. Esta es un área de investigación que está claramente madura para su desarrollo. (15)

### 2.8.6. MUTAGÉNESIS NO ESPECÍFICA

Se han usado varios métodos de mutagénesis "*in vivo*" para producir nuevas actividades enzimáticas las cuales se basan en seleccionar mutantes específicos de bacterias por crecimiento de los organismos en medios con sustratos pobres o no metabolizables. A esta técnica se la conoce con el nombre de evolución microbiana. (10) En esencia, en una población de bacterias existe una proporción que es capaz de adaptarse para crecer en un nuevo componente. En algunos casos, esto conlleva la producción de una forma mutante de una enzima mientras, que en otras circunstancias, el fenotipo alterado es consecuencia de un cambio en la regulación genética. Se han documentado varios ejemplos de evolución microbiana bien caracterizados.

La bacteria *Klebsiella aerogenes* crece solamente en presencia de la pentosa D-arabinosa. Sin embargo, es posible seleccionar mutantes con una velocidad aumentada de crecimiento.

En estos mutantes la L-fucosa isomerasa, que tiene una mínima actividad hacia D-arabinosa, no está regulada y la enzima se produce constitutivamente. En consecuencia, la nueva enzima constitutiva, que se produce en cantidades muy aumentadas, es capaz de arreglarselas, aunque ineficientemente, con la isomerización de la D-arabinosa, incluso cuando no ha habido una mutación o en un gen estructural. Con posterioridad, es posible aislar mutantes que sufran un cambio en un gen estructural, tal como la L-fucosa isomerasa, que tenga una afinidad aumentada para la D-arabinosa. Por tanto gracias al rápido crecimiento y división de los microorganismos, es posible generar nuevas actividades enzimáticas en un tiempo relativamente corto.

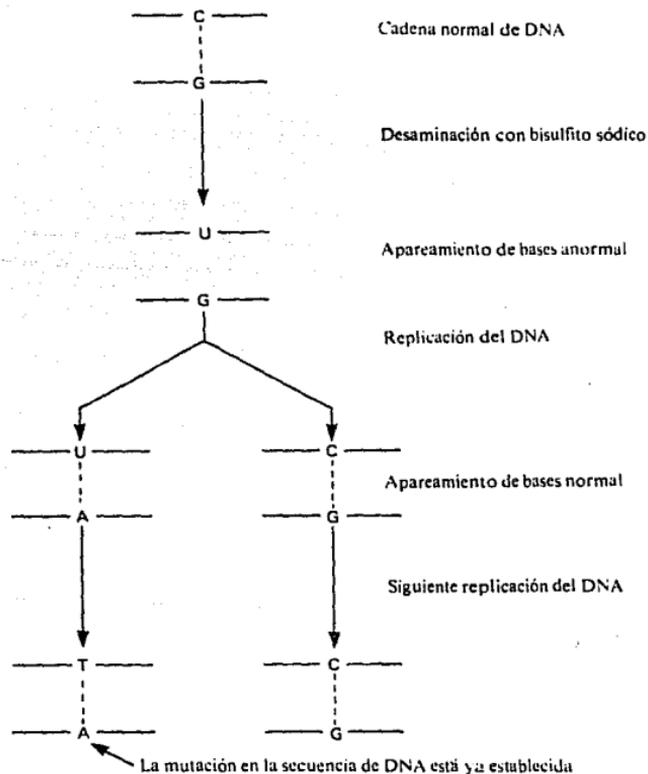
Si bien la técnica de seleccionar mutantes sólo es fácilmente aplicable a microorganismos, supone un cambio de obtención de enzimas que son activas para determinar sustratos, sin necesidad de conocer los mecanismos enzimáticos. (8,15)

### 2.8.7. MUTAGÉNESIS DE SITIO ESPECÍFICO

Aunque las radiaciones (por ejemplo, la luz ultravioleta) y las sustancias químicas (por ejemplo, la hidroxilamida) se han utilizado para producir mutaciones al azar en el DNA, ahora es posible utilizar procedimientos que son mucho más específicos para producir mutaciones (40). Estas técnicas, utilizadas en conjunción con la tecnología del DNA recombinante, crean mutaciones en lugares específicos dentro de la molécula de DNA, ocasionando cambios predecibles en las propiedades de la enzima codificada por el mismo.

#### MUTAGÉNESIS QUÍMICA

Ciertas sustancias químicas pueden alterar la estructura de bases seleccionadas dentro de la molécula de DNA. Una de las técnicas más utilizadas consiste en desaminar *citocina* para producir *uracilo*, por tratamiento del DNA con bisulfato, pero actúa de un modo equivalente a la *timina*. Este cambio, es mutagénico porque durante la siguiente replicación del DNA "*in vivo*", la citosina podrá ser el molde para la incorporación de *guanina*, mientras que el uracilo aparecerá con la base adenina (figura 8.1). Es esencial que estos experimentos se realicen con cepas de *E. Coli* deficiente en el mecanismo de reparación del DNA uracilo-N-glucosidasa, de otro modo, el uracilo, será eliminado y reemplazado por la base correcta.



**Figura 8.1** Efecto de la desaminación de la citosina en la replicación del DNA. (15)

La belleza del método del bisulfito sódico radica en que la desaminación puede estar limitada. La citosina es desaminada eficientemente por el bisulfito sódico sólo cuando está presente un DNA de banda simple. Por esta razón, usando endo y exonucleasas específicas para cortar una parte pequeña de banda de DNA que es normalmente de banda doble, es posible predeterminar el sitio donde va a tener lugar la mutagénesis. La principal desventaja de este método es que sólo es posible realizar la transición citosina auracilo. Aunque otros agentes químicos son capaces de generar mutaciones en otras bases estos métodos son todavía de limitada aplicación. (8,46)

#### **MUTAGÉNESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS**

Uno de los mayores avances en la tecnología de enzimas durante los últimos años ha sido el desarrollo de la mutagénesis de *oligonucleótidos*. En un principio el método permite realizar un cambio predeterminado en una proteína por medio de una mutación específica en el gen que codifica. Esta técnica se ha simplificado mucho gracias al avance espectacular que ha experimentado la síntesis química de oligonucleótidos, y a la caracterización y empleo de fagos filamentosos, como por ejemplo, el M13 (figura 8.2)

Las técnicas de mutagénesis de oligonucleótidos (figura 8.3 y 8.4) se han desarrollado muy rápidamente durante los últimos años y ahora se dispone, comercialmente de los equipos adecuados para realizarlas. Esto abre las puertas a los enzimólogos, para modificar específicamente enzimas utilizando técnicas sofisticadas, sin necesidad de grupos de investigación altamente especializados en biología molecular. Verdaderamente la mutagénesis de oligonucleótidos está convirtiéndose rápidamente en una de las herramientas más importantes de las que dispone el enzimólogo y experimentarán un gran crecimiento durante los próximos años. (15,46)

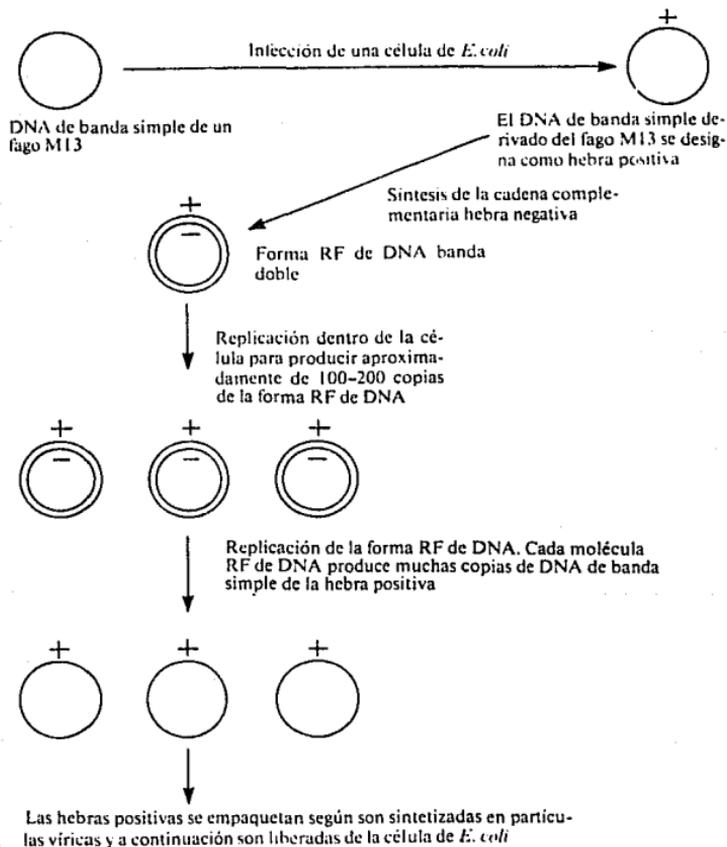
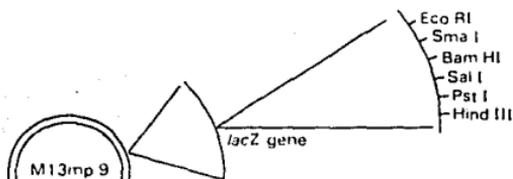


Figura 8.2 Ciclo de vida del fago filamentosos M13. (15)



Derivado M13 mp9 con el gen *lac Z* insertado. El gen *lac Z* codifica para la  $\beta$ -galactosidasa y también contiene una serie de lugares de restricción únicos.

Cortar el DNA que va a ser clonado y el M13 mp9 con la misma endonucleasa de restricción. Utilizar la DNA ligasa para unir el inserto de DNA extraño al vector M13 mp9.

Transformar una cepa de *E. coli* deficiente en  $\beta$ -galactosidasa con la mezcla y plaquear en agar que contenga isopropil- $\beta$ -D-galactopiranos (un inductor de la  $\beta$ -galactosidasa) y X-gal (un sustrato cromogénico para la  $\beta$ -galactosidasa).

Los derivados M13 mp9 que contengan fragmentos de DNA insertados en el gen *lac Z* no expresarán la  $\beta$ -galactosidasa (inactivación por inserción) y producirán placas blancas. Los derivados de M13 mp9 no recombinantes producirán placas azules como resultado de la expresión del gen *lac Z* intacto.

Seleccionar las placas blancas, aislar el DNA del fago, y secuenciar desde el lugar Hind III para determinar la orientación del inserto.

Figura 8.3 Selección de fagos M13 que contienen DNA recombinante. (15)

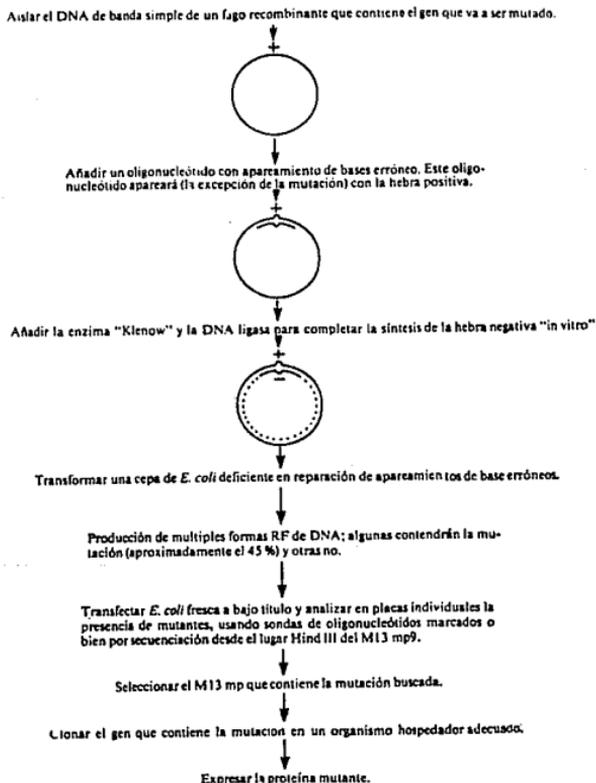


Figura 8.4 Mutagénesis de oligonucleótidos utilizando como vectores fagos M13. (15)

## 2.9 UNIDAD IX

### APLICACIONES DE LAS ENZIMAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

#### 2.9.1. INTRODUCCIÓN

Los catalizadores biológicos (enzimas) son capaces de generar cambios en los alimentos, estos cambios pueden ser deseables o indeseables, y debe ser un propósito de los profesionales relacionados con los alimentos, el control de estos cambios en uno o en otro sentido.

Dentro de los cambios deseables, resaltan aquéllos que se llevan a cabo gracias a la aplicación de enzimas comerciales en los distintos procesos de industrialización de alimentos, esto además, ofrece ventajas con respecto a la versatilidad, precisión, eficiencia y economía del mismo proceso. (1)

Desde hace varias décadas la industria agroalimentaria ha utilizado a las enzimas para mejorar y transformar las propiedades de algunas materias primas. Al principio algunas aplicaciones —en las que se emplean básicamente enzimas de origen vegetal, animal o de fermentaciones controladas— fueron extremadamente empíricas y difíciles de reproducir. La aplicación en escala industrial de la catálisis enzimática es el resultado de la elucidación de los principios fundamentales de esta área de la bioquímica y de la posibilidad de producir enzimas a gran escala, principalmente a partir de cultivos microbianos. En la actualidad hay una creciente tendencia a usar enzimas de origen microbiano en lugar de la de origen vegetal o animal, tanto porque aquéllas son de más fácil obtención como porque poseen propiedades más adecuadas de termoestabilidad, resisten más las fluctuaciones de pH, etcétera. (27)

En esta unidad se revisarán las principales aplicaciones de las enzimas en la industria de los alimentos.

### **2.9.2. CONSIDERACIONES ECONÓMICAS**

El ahorro conseguido al usar enzimas puede lograrse mediante la sustitución de una parte de un proceso o bien mediante el reemplazo total del mismo. Por otro lado, al volverse más eficientes los procesos, también se ahorra dinero de varias maneras; operaciones como el mezclado, la filtración y la evaporación pueden alcanzar rendimientos mayores; esto es, una mayor cantidad de material, puede ser procesado con el mismo equipo, usando menos energía. Los rendimientos de algunas operaciones como la extracción pueden aumentarse considerablemente con el uso adecuado de enzimas añadidas. El conferir propiedades funcionales deseables a una materia prima o a un producto, también representa ventajas desde el punto de vista económico. Las ventajas económicas mencionadas anteriormente, se ubican adecuadamente en cada una de las industrias en donde sean aplicables estos conceptos. (1)

### **2.9.3. INDUSTRIAS QUE UTILIZAN ENZIMAS**

En esta unidad se pretende que los alumnos conozcan las diversas industrias de alimentos donde se involucran las enzimas exógenas, es decir, las que se añaden con un propósito determinado dentro de los procesos de producción. (1)

La intención en esta unidad, y en este punto en particular, es que los alumnos del P.T. preparen seminarios donde se incluya: una pequeña introducción, un listado de enzimas, mencionando el punto de proceso donde intervinen, así como las acciones y cambios que se generan con su aplicación en cada una de las industrias que se mencionan en el programa teórico. Con el objeto de hacer más

claro lo que se pretende, a continuación se presentará un ejemplo de cómo debe ser preparado el seminario. Para este fin usaremos como modelo a la industria de jugos.

### **INDUSTRIA DE JUGOS**

La industria de jugos abarca la producción de jugos, néctares, purés y papillas a partir de frutas o vegetales. Por la diversidad de productos finales y de materias primas, no es difícil imaginar las múltiples aplicaciones de enzimas exógenas, para conseguir las características finales buscadas. El tipo de enzimas que más se involucran en esta industria son sin duda alguna las pectinasas, cuyas aplicaciones generales son las siguientes:

- Clarificación de jugos de frutas
- Tratamiento enzimático de pulpa
- Maceración de frutas y vegetales
- Licuefacción de frutas y vegetales
- Aplicaciones especiales (agentes de turbidez)

Durante el procesamiento de los alimentos que contienen pectinas pueden suceder muchos cambios causados por varias enzimas naturales que actúan sobre estos polisacáridos. Las enzimas pécticas se encuentran en diferentes plantas y en frutas y además son sintetizadas por varios microorganismos.

La aplicación de enzimas antes del prensado en el procesamiento de uvas, manzanas, peras, fresas, zarzamoras y frambuesas, es hoy en día, un proceso estándar en casi todos los países del mundo. La despectinización de jugos después del prensado, se necesita siempre que se deseen jugos clarificados. Si el objetivo es la producción de concentrados de jugos de frutas, la despectinización es necesaria para prevenir la gelificación de los mismos. (33)

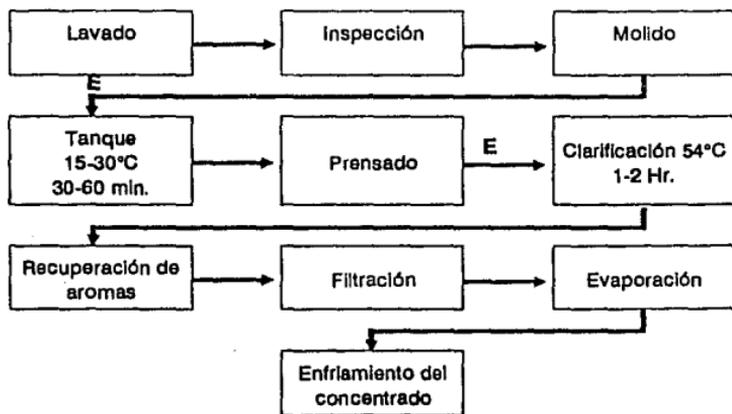
Las preparaciones de enzimas pectolíticas también son usadas en la industria de cítricos. En el proceso de lavado de la pulpa, las enzimas se añaden para reducir la viscosidad de manera que se prevenga la gelificación durante la concentración.

La aplicación de enzimas en el procesamiento de diferentes frutas es muy amplia; existen industrias que aún no aprovechan las ventajas que su uso ofrece, sin embargo, existen estudios donde se indican las ventajas de su uso en productos tan abundantes en México como los plátanos y el mango. (32)

Se ha elegido un proceso representativo de producción de jugo, el cual utiliza una fruta como materia prima. Como se ha mencionado, existen diversos procesos para las diferentes variedades de frutas; por lo que es importante mencionar que solo se tratarán los aspectos principales de la elaboración de jugo de manzana ya que nosotros consideramos que este proceso ejemplifica de manera adecuada, algunos de los puntos antes mencionados.

**JUGO DE MANZANA**

Dentro de la industria de jugos, el de manzana ocupa un lugar importante por su alto volumen de producción y consumo a nivel nacional. En su proceso de fabricación se requiere eliminar pectina y otros polisacáridos (clarificación) para que el aspecto final sea más atractivo, lo que lo hace comercialmente más aceptable. Este proceso se ilustra en el diagrama 9.1:



*Diagrma 9.1*

E = Enzima

(Tomado de Alvarez y Arrollo, 1991.)

Los parámetros que afectan la clarificación son el pH, la temperatura, el tiempo de contacto y la concentración de enzimas. La variedad y la madurez de la fruta influyen en el pH del jugo de manzana, un jugo con menor pH clarifica más fácilmente que uno con un pH más alto. Un defecto

que puede aparecer en el jugo de manzana es el llamado turbidez de almidón que se desarrolla cuando el jugo es preparado con manzanas inmaduras que contienen hasta el 15% de almidón. El almidón puede ser removido por amilasas fungales (diastasa) añadidos al jugo con previo calentamiento a 77°C, para gelatinizar el almidón enfriado a 52°C antes de la adición de la diastasa. (24)

En la fruta inmadura la pectina está presente en forma insoluble, algunas veces llamada protopectina que es responsable de la dureza de la fruta. Debido a esta solubilidad parcial en esta etapa, parte de la pectina pasa a formar parte del jugo durante el prensado, lo cual conduce a un incremento de la viscosidad y dificulta obtener rendimientos óptimos en la extracción del jugo. Las dificultades antes mencionadas, pueden superarse tratando la pulpa de fruta con una preparación de enzimas pectolíticas antes del prensado. Una buena clarificación y filtración del jugo prensado se consigue con una completa despectinización por medio de una preparación de pectinasas. (1)

### **ENZIMAS QUE DESDOBLAN EL ALMIDÓN**

#### **AMILOGLUCOSIDASAS**

El jugo de manzana frecuentemente contiene cantidades considerables de almidón. El almidón debe ser removido si la intención es producir jugos clarificados. La amiloglucosidasa degrada el almidón hasta glucosa. (32)

#### **CELULASAS**

La adición de esta enzima conduce a altos rendimientos y a mejores colores en la extracción. (32)

## ARABANASA

El polisacárido arábano puede causar turbidez en los jugos concentrados. Las preparaciones comerciales de pectinasas contienen suficiente actividad de arabanasa para prevenir esta turbidez. (32)

## DIASTASAS

Se han empleado para eliminar el almidón de los jugos de frutas no maduras, con lo cual se elimina la turbidez indeseable. (38)

### 2.9.4. ENZIMAS INDESEABLES EN ALIMENTOS

Las enzimas indeseables en alimentos en general son aquellas que causan reacciones de oscurecimiento o pardeamiento, este tipo de reacción es muy común en frutas y vegetales que han sufrido daños físicos y exponen su tejido interno al aire y a la luz; el hecho de que estas reacciones no se efectúen en las células intactas indica que existe un microambiente anaeróbico dentro del fruto que inhibe los mecanismos de oscurecimiento; la fruta se oscurece debido a reacciones enzimáticas que dan como producto final pigmentos oscuros llamados melaninas. Las enzimas que efectúan esta reacción pertenecen al grupo de las oxidoreductasas, y son conocidas con diferentes nombres: *fenoloxidasas*, *tirosinasas*, *catecolasas*, *fenolasas*, *polifenoloxidasas* y *polifenolasas* (EC.1.10.3.1). Los sustratos más comunes para las enzimas son compuestos insaturados como los monofenoles y o-difenoles, al igual que los flavonoides y los taninos, en los que el oxígeno actúa como aceptor de los hidrógenos provenientes de estas reacciones. Las enzimas mencionadas anteriormente también pueden utilizar como sustrato la tirosina

(que se encuentra en las papas), la dihidroxifenilalanina, el ácido cloragénico (en manzanas y peras) el ácido gálico y varias hidroquinonas. Algunas fenolasas requieren iones cobre como contactor, sea en forma monovalente, como en el caso de las fenolasas de champiñones, o divalente, como en el de las papas. (4,9)

Las fenolasas son abundantes en frutas como la manzana, el albaricque, el plátano, la pera, la fresa y otras, pero no se encuentran en frutos ácidos como la lima, toronja, naranja, melón, tomate, por lo que en estos últimos no existe el problema de reacciones de oscurecimiento enzimático.

Generalmente, estas enzimas presentan dos tipos distintos de actividad enzimática, por los cuales se efectúan las reacciones de oscurecimiento; dicha actividad se ha dividido en: a) fenol hidroxilasa o cresolasa, que hidroxila normalmente los anillos aromáticos en posición "para" y forma hidroxiquinonas; b) Polifenol oxidasa o catecolasa, que efectúa una oxidación y produce una o-quinona.

Dada la poca aceptabilidad de los frutos o vegetales dañados por las reacciones de oscurecimiento es sumamente importante el tratar de inhibirlas o sea tratar que estas reacciones no se den, que es lo que hablaremos a continuación.

### **CONTROL DEL OSCURECIMIENTO ENZIMÁTICO**

La tecnología de alimentos ha logrado implementar algunos métodos para controlar y evitar la influencia de las enzimas que originan el oscurecimiento; sin embargo, en algunos casos como en los jugos de manzana, se desea un cierto oscurecimiento para impartirle un color adecuado al producto. Los métodos comerciales más comunes para el

control de las reacciones de oscurecimiento enzimático incluyen el tratamiento térmico, el uso de sulfitos y ácidos y la eliminación de oxígeno. La intensidad del tratamiento térmico necesario para inactivar las enzimas depende del pH, la presencia de sales y el grado de aereación; es necesario considerar, que el calentamiento de los frutos y sus derivados puede traer consigo que estos adquieran una textura poco deseada o perder algunos de sus nutrimentos. (4,9)

La adición de sulfito y sus derivados es una práctica común en la industria alimentaria para controlar las reacciones de oscurecimiento; los principales compuestos que pertenecen a este grupo son el anhídrido sulfuroso y el sulfito, el bisulfito, el metasulfito y el tiosulfato de sodio. Estos compuestos, además de evitar la acción de las fenolasas, previenen la pérdida de vitamina C.

Por otra parte, los diferentes ácidos comerciales (málico, fosfórico, cítrico y ascórbico), al igual que los jugos de limón y de otros cítricos, también se emplean para evitar la acción dañina de las fenolasas. Los ácidos ascórbico y cítrico pueden inhibir a las enzimas debido a su capacidad reductora, por una interacción directa con la enzima.

El método de la eliminación de oxígeno resulta verdaderamente difícil y en muchos casos muy poco ventajoso, aunque se pueden usar varios tipos de empaque que evitan el contacto con el aire y el alimento. La eliminación completa del oxígeno no es muy recomendable ya que esto hace que el tejido vegetal adquiera características anaeróbicas presentándose reacciones metabólicas que pueden dañar al fruto. (4,9)

### 2.9.5. ENZIMAS USADAS COMO PARÁMETROS DE CONTROL DE CALIDAD

La actividad enzimática residual en algunos alimentos procesados térmicamente se ha utilizado como parámetro de control de calidad durante su elaboración; el tratamiento de pasteurización de la leche tiene como finalidad la destrucción de la *rickettsia Coxiella burnetii*, causante de la fiebre Q; sin embargo, dado que este calentamiento también inactiva a la *fosfatasa alcalina*, se mide la actividad enzimática residual después de la pasteurización para determinar en forma indirecta la eficiencia del proceso. Por otra parte, la *peroxidasa* de la leche sobrevive a la pasteurización, pero se destruye con tratamientos térmicos más intensos; su ausencia en la leche es indicio del empleo de calentamientos muy fuertes. De igual forma, la determinación de la peroxidasa se usa como índice de destrucción de la lipoxigenasa, la clorofilasa y otras enzimas en el escaldado de frutas y vegetales. (4,9)

Las enzimas más importantes que se utilizan como índices para el control de calidad de los alimentos se ilustran en el siguiente cuadro:

Fosfatasa alcalina	Adecuada pasteurización de la leche
Catalasa	Mastitis en vacas
Peroxidasa	Intensos tratamientos térmicos de la leche
Peroxidasa y catalasa	Tratamientos térmicos de frutos y vegetales enlatados
Invertasa	Pasteurización de la cerveza
Peroxidasa y catalasa	Contaminación de hongos en frutas secas
Deshidrogenasa	Contaminación microbiana en leches
Aamilasa	Pasteurización de huevos

### **2.9.6. TÉCNICAS INDIRECTAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN DIVERSOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS**

Cuando hablamos de técnicas indirectas, nos referimos a aquellas técnicas que miden parámetros distintos a la propia actividad enzimática, por ejemplo, evaluación de turbidez, color, índice de refracción, etcétera, y que de esta manera, se pueda conocer la presencia o bien los efectos de dicha enzima. La finalidad del uso de técnicas indirectas es ofrecer métodos de análisis sencillos que no requieran de una infraestructura costosa y sofisticada, que puedan ser llevadas a cabo por la mayoría de los laboratorios de control de las diferentes industrias, obteniendo así, los beneficios que de estas técnicas indirectas se derivan. (1)

En la información que se presenta a continuación se mencionará la aplicación, el principio, las ventajas y desventajas, y el equipo necesario para llevar a cabo la aplicación de una técnica indirecta para determinar actividad enzimática.

#### **MONITOREO DE PROTEASAS**

La hidrólisis de un enlace peptídico en una proteína ofrece potencialmente varias maneras de monitorear el avance de la reacción. Por cada enlace peptídico hidrolizado se genera un ácido carboxílico y un grupo amino, el número de moléculas se incrementa. Las pruebas que pueden emplearse para los monitoreos del efecto de las proteasas en los alimentos evalúa a los compuestos generados por la hidrólisis dentro de estos podemos mencionar a los siguientes:

## **Propiedades Reológicas de la Masa**

*Aplicación.* Las propiedades reológicas de la masa, determinadas con instrumentos diseñados para valorar ciertos atributos físicos, constituyen índices valiosos del efecto de las enzimas sobre la masa para elaborar pan y galletas.

*Principio.* Los equipos utilizados para medir los cambios experimentados por las masas después de la aplicación de enzimas son los siguientes:

### **+ Amasadoras con Registrador**

Registan los cambios experimentados por las propiedades reológicas sobre la masa (tiempo pico, estabilidad, evolución del gluten, absorción de agua, etc.)

### **+ Extensógrafo o Alveógrafo**

Registra la extensibilidad de la masa bajo una fracción uniforme. (1)

### **Análisis de Nitrógeno Libre (Grupo Amino)**

*Aplicación.* Este método es usado principalmente para determinar el grado absoluto de hidrólisis. Estos procedimientos son complejos y tardados. Por su precisión estos métodos se usan como estándar para calibrar procedimientos más rápidos para realizar en la línea de producción.

**Principio.** La hidrólisis de un enlace peptídico genera una amina y un ácido carboxílico. El grupo amino se considera libre y puede reaccionar con compuestos químicos para generar compuestos coloridos. Esto puede ser medido en un espectrofotómetro.

**Ventajas y Desventajas.** La ventaja de estos métodos es que proporciona valores absolutos. Son los métodos indicados para determinar el grado absoluto de hidrólisis. Las desventajas son la complicada preparación de las muestras, así como el tiempo requerido para ello; requiriéndose mano de obra calificada.

**Equipo.** El método del TNBS (ácido trinitrobenzen sulfónico) requiere un baño de temperatura constante (60°C), un espectrofotómetro y un potenciómetro.

#### **Análisis por Viscosimetría (47,48)**

**Aplicación.** Este método puede ser usado siempre que se observe un cambio de viscosidad durante la hidrólisis. Los cambios de viscosidad son más dramáticos en las primeras etapas de la hidrólisis, lo que hace que este método sea más útil para el monitoreo de bajos grados de hidrólisis. Puede ser usado para hacer mediciones en líneas de proceso.

**Principio.** La viscosidad o la resistencia al flujo de un material tiene la ventaja de poderse relacionar con la hidrólisis de una suspensión proteica. Una disminución de la viscosidad, dentro de ciertos límites, puede correlacionarse con una disminución en el peso molecular. Este fenómeno ha sido utilizado como una forma de describir varias enzimas hidrolíticas.

**Ventajas y Desventajas.** Monitorear una proteólisis mediante una reducción de viscosidad puede ser un método rápido; es un método de fácil adaptación para pruebas en línea de proceso. Un problema es que los cambios más dramáticos y más fácilmente medibles en la disminución de la viscosidad se observan en las primeras etapas de hidrólisis, mientras que los cambios en viscosidad tienden a ser menores en las últimas etapas de hidrólisis donde los cambios son más difíciles de medir.

**Equipo.** Existen diferentes equipos regidos bajo diferentes principios para medir la viscosidad, estos principios incluyen, la rotación, la flotación y flujo capilar.

#### **Análisis por Osmometría (14,18)**

**Aplicación.** Esta técnica es ideal para monitorear procesos proteolíticos. Es rápida y se recomienda para procesos que duren 1-2 horas.

**Principio.** El número de moléculas en una solución determina la presión osmótica, el punto de congelación y la presión de vapor de la muestra. Conforme cambian las moléculas en una solución debido a la acción enzimática, estas propiedades también cambian. Los osmómetros están calibrados para leer presión osmótica.

**Ventajas y Desventajas.** Una medida puede llevarse a cabo en menos de cinco minutos. Su única desventaja es el decremento de la presión osmótica, el punto de congelación y la presión de vapor, este último aspecto pueden no ser significativo en algunas sustancias; puede ser necesario correlacionar este método con el TNBS. Este método no es efectivo en presencia de grandes cantidades de sal.

**Equipo.** Existen dos tipos de osmómetros, los que miden el punto de congelación y los que miden el punto de vaporización. (1)

### **Análisis de Cambios de pH (2)**

**Aplicación.** Esta técnica se adapta mejor a procesos de hidrólisis proteica que se lleven a pH's mayores de 6.5 con resultados óptimos entre pH 7.5-9.0. Debe ser considerado cuando se requiera una hidrólisis muy precisa.

**Principio.** Conforme una proteasa rompe enlaces peptídicos, se producen grupos que pueden ser titulados. En pH's neutros o débilmente alcalinos, esto tiende a desplazar el pH hacia el lado ácido. El pH de la reacción puede mantenerse adicionando hidróxido de sodio. La cantidad de dicha base (NaOH), adicionada para mantener un pH constante puede relacionarse con la actividad proteica; con la relación siguiente:

$$GH = [ \frac{BXN}{M} ] (1) [ \frac{1}{h} ] \times 100\%$$

Donde:

GH: grado de hidrólisis. Porcentaje de enlaces peptídicos desprendidos por la proteasa

B: volumen de la base añadida (ml)

N: normalidad de la base (mea/ml)

M: masa de proteína en reacción (gramos)

1/ y 1/h: constantes disponibles en la bibliografía

*Ventajas y Desventajas.* Esta técnica de seguimiento de pH constante, es un método simple y preciso para monitorear la actividad proteica. Es independiente de la variación de sus-trato de la dosis de enzima y de la temperatura de reacción.

La única desventaja de este método es la adición de minerales al producto. Para productos que no deban tener un alto contenido de cenizas se puede usar la técnica de caída de pH. Conforme actúa la proteasa en la proteína el pH decrece. El pH de la reacción se estabiliza en algún valor del rango ácido (pH de 5 para proteína de soya). Conforme el pH se aleja del pH óptimo de la enzima la actividad enzimática también decrece.

*Equipo.* El equipo requerido para esta técnica es un potenciómetro y un mezclador. (1)

Al igual que se han descrito algunas técnicas indirectas para monitorear *proteasas*, existen otras técnicas indirectas para poder monitorear otras enzimas como: *carbohidrasas*, *lipasas*, etcétera, de las cuales ya no se hablará aquí recomendando al estudiante recurrir a la referencia 2 si está interesado en saber qué otras técnicas indirectas existen para monitorear enzimas.

## 2.10 UNIDAD X

### PERSPECTIVAS FUTURAS

#### INTRODUCCIÓN

Los últimos veinticinco años, aproximadamente, han supuesto una notable expansión en la industria enzimática. Sin embargo, no todo se ha desarrollado sin incidentes desafortunados, recuerdese el desastre de los últimos años de la década de los setenta cuando fueron consideradas perjudiciales las enzimas contenidas en polvos de lavar, resultando de ello un retroceso en el mercado. La predicción del crecimiento del mercado enzimático para los próximos veinticinco años y la identificación de futuras aplicaciones presentan dificultades y quizás no sea apropiado tratar dichas cuestiones en el contexto de este manual. Por esta razón, en esta unidad pretendemos subrayar algunos de los que consideramos los principales retos para el enzimologista en los próximos años, cada uno de los cuales, una vez resueltos, significarían progresos en el apuntalamiento científico.

En esta unidad hemos escogido discutir dos áreas de investigación: predicción del plegamiento/estructura de las enzimas y utilización de enzimas en solventes orgánicos. Cada una puede ser identificada como un problema fundamental dentro del cual los avances en nuestro conocimiento básico fomentará el desarrollo de nuevas operaciones. Esta selección de dos puntos intenta ilustrar el futuro potencial de la ingeniería enzimática y no es, de ningún modo, exclusiva de otras posibilidades.

### 2.10.1. PREDICCIÓN DEL PLEGAMIENTO/ESTRUCTURA DE LA ENZIMA

Experimentos llevados a cabo hace más de 25 años dejaron establecido que en la secuencia primaria de la cadena de polipéptido estaba contenida toda la información necesaria para el correcto plegamiento de una proteína. Sin embargo, aunque se disponga de la secuencia de aminoácidos de una nueva cadena polipeptídica, los bioquímicos no son capaces aun de predecir exactamente la pauta de plegamientos que seguirá. Es por esto, que es cada vez más importante ser capaz de determinar la estructura tridimensional de una enzima en particular si se utiliza la técnica de mutagénesis dirigida para modificar propiedades. Claramente, se necesita conocer la posición y el tipo de cambio en la estructura de aminoácido que debería hacerse para obtener unos resultados efectivos. En otras palabras, tiene que existir un mecanismo racional si los cambios son hechos de otra manera que no sea aleatoria.

Para ser capaz de determinar la estructura tridimensional de una enzima es necesario conocer la secuencia primaria. Los métodos para conocer la estructura primaria polipeptídica han avanzado enormemente. (20) Las proteínas pueden ser secuenciadas directamente utilizando variaciones en el procedimiento de degradación de Edman (figura 10.1), en la práctica, con equipo y reactivos de buena calidad, es posible secuenciar de treinta a sesenta residuos de aminoácidos en un único proceso antes que las pérdidas y las reacciones laterales lleguen a ser prohibitivas. Se dispone de métodos manuales y automáticos. Pero hoy en día, a menudo es preferible determinar la secuencia primaria de una proteína indirectamente, por secuenciación del gen (39).

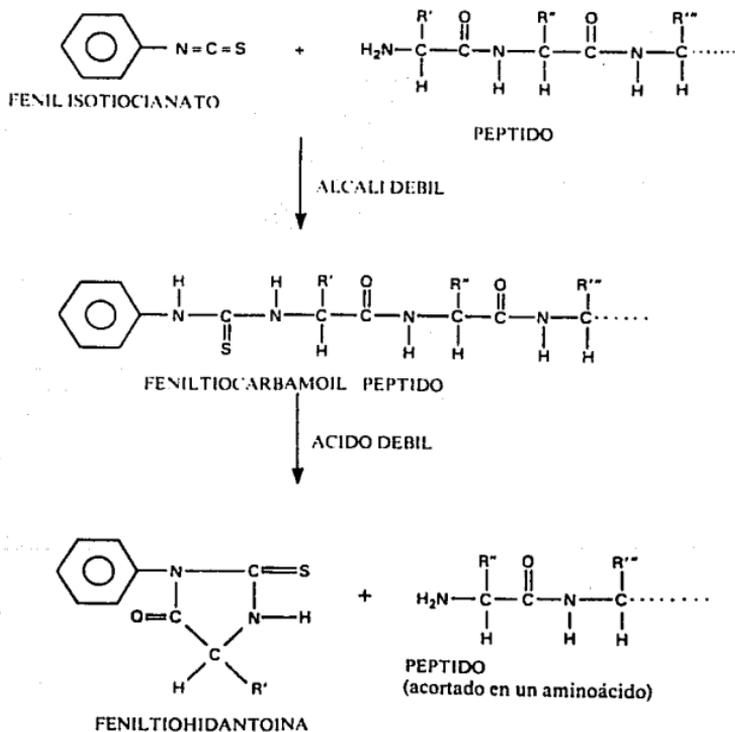


Figura 10.1 Secuenciación de polipéptidos utilizando el reactivo de Edman. (15)

El aislamiento y la clonación de la porción apropiada de ADN seguido de la secuenciación, utilizando el sistema del fago M13, con el método de Sanger de terminación de la cadena con dideoxinucleótidos es frecuentemente más rápido y más exacto que trabajar directamente sobre la proteína.

La predicción exacta de la estructura tridimensional de una enzima, a partir únicamente de la secuencia de aminoácidos no es aun posible a pesar del desarrollo de algoritmos y del advenimiento de las supercomputadoras. (42)

Los métodos actuales para determinar la estructura y dimensión de las proteínas, se limita al análisis de difracción de rayos X. Convencionalmente, los cristales son bombardeados con rayos X y se analizan los protones de difracción. La limitación de esta difracción convencional de rayos X es que, si bien las posiciones de los átomos mayores pueden ser determinadas con precisión, la localización precisa de los protones es menos clara. Más recientemente, se han utilizado fuentes de rayos Z de sincrotrón, los cuales han permitido que se puedan obtener los datos con más rapidez. (15)

Un problema con la difracción de rayos X es que la proteína debe estar cristalizada y esto realmente suscita la cuestión de la cual pudiera ser su estructura en solución. Una técnica que ha mostrado una gran potencia es la resonancia magnética nuclear bidimensional de protón. Con el advenimiento de imanes superconductores que producen campos magnéticos de alta consideración, en conjunción con la espectroscopia nuclear bidimensional Overhauser, es ya posible hacer asignaciones individuales para la mayoría de las líneas de resonancia de aspecto  $^1\text{H-NMR}$  de una proteína. Además, de la información semicuantitativa sobre distancia protón-protón puede ser obtenida al nivel de 2 a 5 Å.

La elucidación de la estructura proteica tridimensional es todavía uno de los aspectos que más tiempo consume en la tecnología enzimática y cualquier avance en esta área producirá probablemente un gran impacto. (15,46)

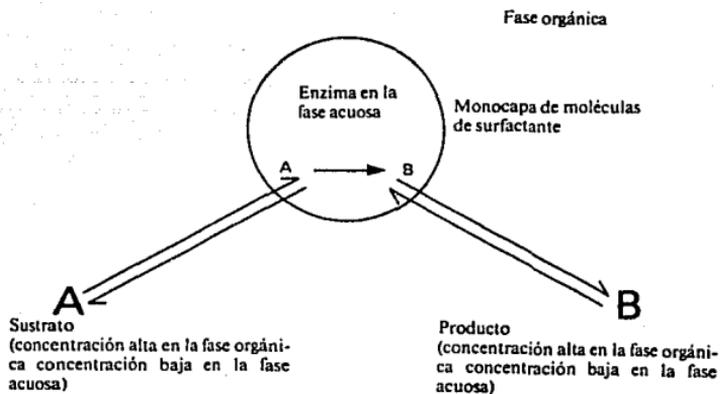
### **2.10.2 UTILIZACIÓN DE ENZIMAS EN SOLVENTES ORGÁNICOS**

Muchos procesos convencionales en la industria están basados en sistemas que utilizan disolventes orgánicos y compuestos hidrofóbicos. No obstante, en el pasado se consideró que las enzimas no toleraban soluciones no acuosas y que por consiguiente resultarían inadecuadas como catalizadores en dichas circunstancias. Estas ideas estaban basadas en antiguas observaciones; disolventes orgánicos miscibles tales como la acetona por ejemplo, habían sido utilizados para la precipitación selectiva de proteínas durante los procedimientos de purificación. Además, en aquellos casos donde se encontró que las enzimas podían funcionar en un sistema no acuoso, los parámetros cinéticos resultaban, a menudo, adversamente afectados. Una observación típica es la realizada en la hidrólisis del benzoil arginina etil éster catalizada por tripsina en mezclas dioxano-agua. En este caso, el valor de  $K_m$  aumenta de 1,000 a 5,000 veces en dioxano al 80% (N/V) comparado con ambiente totalmente acuoso. Este cambio en la  $K_m$  fue atribuido a un incremento en la repulsión de largo alcance entre la tripsina cargada positivamente y las moléculas de sustrato, la cual aumenta, al disminuir la constante dieléctrica.

Cierto número de transformaciones catalizadas por enzimas han sido estudiadas en disolventes orgánicos particularmente aquellas reacciones que incluyen sustrato(s) y/o producto(s) que son particularmente insolubles en agua (25). Es importante diferenciar el funcionamiento enzimático en disolventes miscibles y no miscibles con agua. Los

experimentos establecieron rápidamente que una vez que la concentración de un disolvente orgánico miscible con agua excediera alrededor del 50% (N/V), todas las enzimas excepto las más resistentes, quedaban inactivadas. Desafortunadamente, esta concentración es a menudo insuficiente para solubilizar efectivamente a un sustrato o producto no soluble en agua. Esta observación condujo a la falsa premisa de que un disolvente inmiscible con agua sería incluso más activo desnaturalizando enzimas. Sin embargo, no se ha probado que esto sea así, por lo que el uso de los disolventes inmiscible con agua ofrece muchas más posibilidades de lo inicialmente estimado. Estos sistemas inmiscibles en agua serán considerados aquí con un mayor detalle.

La proporción de agua presente en el sistema global en un conjunto es una consideración importante. Si el contenido de agua es lo suficientemente alto, entonces se forma una microemulsión de agua en aceite con la enzima contenida en la fase acuosa. Sin embargo, si el contenido de agua es reducido, entonces, en presencia de un surfactante apropiado, se forman micelas inversas (figura 10.2). En la práctica, es difícil decidir entre lo que es una micela inversa y lo que es una emulsión de agua en aceite; utilizándose a menudo cuando el contenido de agua es incluso más bajo, entonces la enzima forma partículas insolubles en un disolvente orgánico y el resultado es un sistema de catálisis heterogénea.



**Figura 10.2** Catálisis mediada por enzimas en micelas inversas • (15)

Cada una de las tres variaciones antes mencionadas han sido utilizadas y cada una de ellas tiene sus ventajas en cada caso en particular. Por ejemplo, la conversión de colesterol a colesteroona ha sido estudiada en micelas inversas y en sistemas pobres en agua. La velocidad de la reacción y la estabilidad operacional de la enzima en micelas inversas fueron más altas que en medio acuoso. Sin embargo, se obtuvieron mejores resultados cuando células enteras de *Nocardia* (que tienen colesterol oxidasa) fueron utilizadas en disolventes orgánicos secos.

Aunque, la mayor parte de los avances se han hecho utilizando enzimas en disolventes inmiscibles con el agua, hay ejemplos de aplicaciones útiles en sistemas miscibles. Por ejemplo, se utilizan disolventes miscibles en la resolución óptica de ácidos orgánicos y en la síntesis de péptidos utilizando proteinasas.

La posibilidad de utilizar enzimas en disolventes orgánicos claramente es una área lista para desarrollar. La capacidad de modificar moléculas hidrofóbicas de utilidad en la industria química y la introducción de nuevas reacciones conducirá a toda una serie de nuevas aplicaciones de las enzimas. (8,15).

# APENDICE DEL CAPITULO II



---

## AUTOEVALUACIÓN

---

*A continuación se presenta una serie de preguntas y ejercicios que el alumno debe ser capaz de resolver sin dificultad alguna, después del estudio y discusión de cada unidad del curso teórico, de lo contrario debe reforzar sus conocimientos en aquellas áreas que no domine.*

### UNIDAD I

1. Mencionar brevemente cuales fueron los orígenes históricos de la tecnología enzimática.
2. ¿Cuáles son las principales ventajas del uso de Biocatalizadores o catalizadores biológicos, en determinados procesos de producción?
3. Mencione cuales son las cuatro fuentes de donde es posible obtener a los biocatalizadores.
4. Explicar breve de las ventajas y desventajas que ofrecen cada una de las fuentes de obtención de los biocatalizadores.
5. Ilustrar las áreas dónde los biocatalizadores presentan riesgos potenciales de efectos nocivos.
6. Esbozar cuáles fueron los 5 grupos en los que clasificaron a las enzimas, basándose en la conveniencia para utilizarlas en la industria alimentaria.

7. Citar un panorama general del desarrollo de la industria enzimática a través de los años.
8. Mencione ejemplos que ilustren la importancia de la tecnología enzimática en aspectos relevantes de la ciencia.

## UNIDAD II

1. Explique por qué hoy en día es incorrecto decir que todas las enzimas son de naturaleza proteica estrictamente.
2. Mencione cuáles son las características más relevantes de las enzimas de naturaleza proteica.
3. Estime por qué la "ESPECIFICIDAD" es uno de los atributos más sobresalientes de las enzimas, mencionando las ventajas de este atributo.
4. Enliste las seis clases que la "UIB" recomienda para la nomenclatura de enzimas.
5. Cite ejemplos de nomenclatura enzimática para cada uno de los seis grupos anteriores, incluyendo la configuración o estructura de las enzimas, de sus ejemplos.
6. Muestre la deducción completa de la ecuación de *Michaelis-Menten*.
7. Mencione cuáles son los principales parámetros que afectan la cinética enzimática, y describa brevemente de que forma lo hacen.

8. Infiera sobre cuáles son las principales formas de establecer la actividad que posee una enzima, y en que casos se utiliza cada una de esas formas.
9. Enuncie cuáles son los tipos de inhibición que puede sufrir una enzima?
10. Explique las diferencias que existen entre cada uno de los tipos de inhibición enzimática.
11. Mencione los factores principales que intervienen en la síntesis de enzimas.
12. Ilustre en cuantas etapas se lleva a cabo la síntesis enzimática, explicando brevemente que ocurre en cada una de ellas, señalando los requerimientos principales por etapa.
13. Explique que es el código Genético y cuáles son sus principales características.
14. Esquematice cómo se lleva a cabo el control de la Síntesis de enzimas, ayudándose para ello del ejemplo del operón de lactosa.

### **UNIDAD III**

1. Explique en dónde pueden tener origen las enzimas.
2. Cite 2 ejemplos de enzimas obtenidas de cada uno de los posibles orígenes.
3. Explique las diferencias entre enzimas intracelulares y extracelulares, especificando cuál de los dos tipos ofrece más ventajas.

4. Explique cómo se lleva a cabo el control de la producción microbiana de enzimas.
5. Mencione el principio en el cuál se basan las técnicas de manipulación genética.
6. Ilustre qué es una enzima de restricción.
7. Comente brevemente como ayudan las Técnicas de Ingeniería genética a la producción de enzimas.

#### **UNIDAD IV**

1. Mencione cuáles son las técnicas principales utilizadas para la extracción de enzimas.
2. Cite cuáles son los métodos más utilizados para la purificación de enzimas, mencionando sus principios de funcionamiento.
3. Explique brevemente como se lleva a cabo la purificación a gran escala y mencione cuáles son los principales problemas que se presentan en este tipo de purificación.
4. Ejemplifique brevemente las especificaciones mínimas que debe tener una enzima para poder ser usada a nivel industrial.

## UNIDAD V

1. Cite los tres puntos principales que deben ser tomados en cuenta al estudiar la aplicabilidad comercial de un biocatalizador?
2. Explicar brevemente cómo se lleva a cabo la determinación de la velocidad y la extensión de la reacción de un biocatalizador, ayudándose si es necesario, de deducciones matemáticas.
3. Basándose en su principio de funcionamiento, diga como se clasifican los reactores enzimáticos.
4. Ilustre cuáles son los principales tipos de reactores existentes, ubicándolos en alguno de los tipos señalados en la pregunta anterior.
5. Establezca las diferencias principales que hay entre un reactor de retromezclado y uno de flujo tapón.
6. Valúe en qué casos es más conveniente el uso del reactor de flujo tapón en vez de retromezclado y explique ¿por qué?
7. Describa la reacción de "Haldane" explicando el significado físico de cada una de las literales que en ella aparezcan.
8. Ilustre brevemente cuál es el comportamiento de los reactores enzimáticos.

**UNIDAD VI**

1. Ilustre cuál es el efecto que sufren las enzimas en su "ESTABILIDAD" al ser inmovilizadas?
2. Estime en función de qué parámetros puede variar la estabilidad de una enzima.
3. Explique qué es lo que se persigue en la estabilidad de almacenaje y qué se busca con la estabilidad operacional.
4. Mencione cuáles son las categorías en las que se puede dividir el problema de la búsqueda de la estabilidad operacional.
5. Explique en pocas palabras en que se basa cada una de las categorías de la pregunta anterior.
6. Enumere los principales métodos de inmovilización enzimática, especificando el principio de funcionamiento de cada uno de ellos.
7. Ilustre brevemente los efectos de la inmovilización sobre la actividad catalítica de una enzima.
8. Compile los principales números adimensionales útiles para explicar el efecto de la inmovilización sobre la actividad de una enzima, explicando el significado físico de cada una de las variables que ahí aparezcan.

## UNIDAD VII

1. Especifique las ventajas que ofrece el uso de enzimas inmovilizadas en el análisis, al ser utilizadas como sensores.
2. Explique el principio de funcionamiento de los Reactores Analíticos.
3. Ilustre en qué se basa el funcionamiento de un sensor que tiene a una enzima ligada a un transductor.
4. Cite qué es y cómo funciona un TERMISTOR enzimático.
5. Determine cómo se llevan a cabo las interacciones directas de ENZIMA-ELECTRODO?
6. Mencione la actividad y el uso de algunos otros dispositivos sensores que usted conozca.

## UNIDAD VIII

1. Ilustre qué se pretende al hacer una selección apropiada de la fuente de obtención de una enzima?
2. Determine el principio de funcionamiento, la utilidad y el mecanismo en el que se basan las siguientes técnicas de modificación de enzimas:
  - a) Sustitución de iones metálicos unidos
  - b) Modificación covalente de enzimas
  - c) Modificación enzimática de enzimas
  - d) Complejos enzima-coenzima
  - e) Mutagénesis no específica
  - f) Mutagénesis de sitio específico.
3. Cite ejemplos de enzimas que hayan sido modificadas con éxito por alguna de las técnicas mencionadas en la pregunta anterior.

## UNIDAD IX

1. Explique por qué es importante la aplicación de enzimas en la industria alimentaria.
2. Económicamente ¿cuáles son las ventajas que se obtienen al usar enzimas en los procesos de producción de alimentos?
3. Mencione todas las industrias de alimentos que potencialmente podrían utilizar enzimas en sus procesos de producción, aclarando para qué las utilizarían y que tipo específico de enzima sería adecuado a su proceso.

4. Mencione las principales enzimas indeseables en alimentos diciendo por qué razón son indeseables y cuál es el procedimiento más común para controlarlas.
5. Sintetice cuáles son las enzimas que más se utilizan como parámetros de control de calidad?
6. Evalúe cómo funcionan algunas enzimas que se utilizan para pruebas de control de calidad.
7. Cuando se habla de técnicas indirectas para determinar actividad enzimática, exactamente ¿a qué nos estamos refiriendo?
8. Explique la finalidad o el objetivo que se persigue al utilizar las técnicas indirectas?
9. Ilustre las ventajas y desventajas (si es que las hay) de usar las técnicas indirectas?
10. Mencione la aplicación, el principio, las ventajas, desventajas y el equipo necesario para la aplicación de por lo menos dos técnicas indirectas en la determinación de actividad enzimática.

## **UNIDAD X**

1. Valore cuáles son en general las perspectivas futuras que tiene hoy en día la tecnología enzimática?
2. Explique la utilidad potencial que tiene el hecho de poder predecir el plegamiento/estructura de una enzima.

3. Ilustre en qué se basa la utilización de enzimas en solventes orgánicos y qué utilidad real podría tener en la industria alimentaria.

---

## RECOMENDACIONES GENERALES

---

---

- Es de vital importancia hacer saber al alumno de este paquete que el presente manual puede ser un valioso apoyo para su aprendizaje en la asignatura pero no lo es todo, debido a ésto se recomienda a los estudiantes que una vez revisado y discutido algún tema en particular del curso dicho tema sea complementado y profundizado recurriendo a otras fuentes de información logrando con esto una mejor formación académica.
- Es importante aclarar que éste manual se enfoca con mayor interés y dedicación a la parte teórica del curso, haciendo sólo un esbozo muy general de lo que es la parte práctica o experimental, por lo cual se recomienda al alumno profundizar mucho más en ésta parte, acudiendo a información más profunda y completa sobre este aspecto.
- Se recomienda al alumno revisar y analizar éste documento antes de iniciar formalmente el curso de P.T. de enzimas de uso alimentario, con la finalidad de que logre saber perfectamente que es éste paquete las partes que lo constituyen, la forma en que se trabaja, los temas que se discuten y la forma en que se evalúa, todo esto con la finalidad de que el alumno pueda hacer una adecuada planificación y organización de su trabajo a lo largo del semestre, llevando todo esto a la obtención de mejores resultados, tanto académicos como personales.

- Se recomienda a los estudiantes de éste paquete terminal contestar correctamente las preguntas y ejercicios de la autoevaluación antes de presentar el examen de cada unidad con el objetivo de que puedan darse cuenta de los aspectos en los cuales sus conocimientos no están sólidamente cimentados, debiendo repasar o estudiar más sobre ellos, con lo cual lograrán obtener mejores calificaciones en cada evaluación parcial y por consiguiente en el curso en general.

---

## CONCLUSIONES

---

- Se considera que el presente trabajo ha logrado cumplir el objetivo general para el cual fué planeado, ya que en este documento ha sido posible englobar los aspectos fundamentales del P.T. de enzimas, y creemos que puede ser un material de gran apoyo, tanto para los estudiantes de la asignatura como para los profesores de la misma.
- Se piensa que al elaborar éste trabajo se ha creado una excelente guía de estudios para la parte teórica del paquete, ya que de éste manual los alumnos pueden obtener las bases fundamentales para lograr un mejor aprovechamiento académico del curso teórico.
- Se cree que el hecho de presentar al alumno una compilación de preguntas y ejercicios de los aspectos principales de cada unidad a manera de *autoevaluación* será de gran utilidad y valía para ellos, ya que podrán jugar previo a una evaluación formal cual es su grado de conocimientos y dominio de los temas, pudiendo hacer una recapitación personal.
- Se considera que el presente trabajo puede resultar una buena ayuda para aquellos estudiantes de la carrera de Ingeniería en Alimentos que no tengan clara la decisión por algún paquete terminal de los que se ofrecen en la FESC ya que por medio del conocimiento y análisis de este documento, pueden saber claramente que es y como

funciona el P.T. de enzimas y decidir si éste paquete terminal es el más adecuado para sus inquietudes y aspiraciones profesionales.

- Se piensa que éste documento puede llegar a tener aplicación tanto para otras asignaturas de la carrera de Ingeniería en Alimentos (*Bioquímica, Microbiología, Química de Alimentos, Tecnología de Alimentos IV*) como para otras carreras que se imparten en la FESC (I.Q., Q.F.B.) ya que los temas que se discuten en éste manual no son de aplicación exclusiva para el paquete terminal de enzimas, habiendo áreas y conceptos comunes con las otras carreras profesionales.

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Alvarez Figueroa, M. y Arroyo Nava, G. "*Recopilación de Técnicas de Laboratorio para la Determinación Indirecta de Actividad Enzimática en Alimentos Procesados Industrialmente*".-- México, 1991.-- p.182.-- Tesis (Ingeniería en Alimentos). UNAM, FESC.
2. AOAC OFFICIAL OF ANALYSIS, 1984 p. 150-610
3. Atkinson, B, "*Immobilised cells their applications and potential, in process Engineering aspects of immobilised cell systems*".-- Eds Webb, C., Black, G.M. and Atkinson, B., 1985.-- pag. 3-34.
4. Badui Dergal, Salvador, "*Química de los Alimentos*" -- México: Alhambra; 1989.-- pag. 210.
5. Bergmeyer, H.V, "*Methods of Enzymatic Analysis*".-- Edition Weinheim V.C.H., 1986.-- pag. 103.
6. Bowers, L.D, and Carr, P.W, "*Immobilised Enzymes in analytical chemistry*".-- *Advances in Biochemical Engineering*. 15: 1978, p 89-129.
7. Brown, and Campbell, "*Introducción a la Biotecnología*".-- Acríbia; 1990.-- pag. 236.

8. Chaplin and Bucke, "*Enzyme Technology*".-- Cambridge University., 1990.-- pag. 190.
9. Cheftel, Jean Claude, "*Introducción a la Bioquímica y Tecnología de Alimentos*".-- Zaragoza: Acribia., 1987.-- pag. 192.
10. Clarke, P.H, "*Experiments in microbial evolutions new enzymes, new metabolic activites*".-- Procceding of the Royal society, London. B207: 1980, p 385-404.
11. Danielsson, B, "*Enzyme probes in Comprehensive*".-- Biotecnology. 4: 1985, p 395-422.
12. Danielson, et al. "*The use of an enzyme thermistor in continuous measurements and enzyme reactor control*".-- Biotechnology and Bioengineering. 21: 1979, p 1749-1766.
13. Dealy, John, "*Viscometers for on line Measurement and control*".-- Chemical Engineering. 3: 1984, p 122-138.
14. Egan, Harold et al. "*Análisis Químico de Los Alimentos de Pearson*".-- México: Continental; 1987.-- pag. 150-517.
15. Gacesa, y Hubble, "*Tecnología de las Enzimas*".-- Zaragoza: Acribia; 1990.-- pag. 206.

16. Goldstein, "Kinetic Behaviour of Immobilized Enzyme system".-- *Methods in Enzymology*. 44: 1976, p 397-443.
17. Goldstein, C, and Katchalski-Katzir, E, "Immobilised Enzymes a survey, In Applied".-- *Biochemistry and Bioengineering*. 1: p 1-22.
18. Hart, I. y Fisher, H, "Análisis Moderno de los Alimentos".-- Zaragoza: Acribia; 1971.-- pag. 197.
19. Horvath, C, and Engasser, S-M, "External and Internal diffusion in heterogeneous enzyme systems".-- *Biotechnology and Bioengineering*. 16: 1974, p 909-923.
20. Hunkapiller, M.W, "Protein sequence analysis automated microsequencing".-- *Science*. 219: 1983, p 650-659.
21. Jacobsen, H, Klenow, H, and Overgaard H, "The N-Terminal amino acid fragments obtained by proteolysis".-- *Journal Of Biotechnology*. 45: 1974, p 623-629.
22. Jectham, P.S.J, "The application of Immobilized cells and Biochemical reaction in Biotechnology".-- *Principles of enzyme engineering*.-- England: Wiseman; 1983.-- pag. 208.
23. Kaiser, E.T, "Chemical Mutations of enzyme activities".-- *Science*. 226: 1984, p 505-511.

24. Kilara, A, "Enzymes and their uses in the processed apple industry".-- Process Biochemistry. 120: 1982, p 302-312.
25. Klibanov, A.M, "Enzymes that work in organic solvents".-- Chemtech. 14: 1986, p 354-359.
26. Lehninger, A.L, "Bioquímica".-- Barcelona: Omega; 1989.-- pag. 410
27. Lehninger, A.L, "Principios de Bioquímica" .-- Barcelona: Omega; 1982.-- pag. 610.
28. Lowe, et al. "Some novel biomedical sensors".-- Biotech. 83: 1983, p 633-641.
29. Mertz, "Bioquímica".-- Minesota: Burgess; 1987.-- pag. 360.
30. Mesing, R.A, "Immobilization techniques-enzymes in comprehensive".-- Biotechnology. 2: 1985, p 191-201.
31. Mosbach, K, "Thermal bioanalyses in flow streams: enzyme thermistor devices, analytical".-- Chemistry. 53: 1981, p 83A-94A.
32. Novo Ferment, PECTINEX ULTRA SP-L. La formula 100% y su aplicación en la industria de zumos de fruta. Bioindustrial Group, Dinamarca.

33. Novo Industri Als, "ENZYMES AT WORK". Copenhagen December 1987.
34. Pedersen, H, and Horvath, C, "Open tubular heterogeneous enzyme reactors in continuous, flow analysis, In Applied".-- Biochemistry and Bioengineering. 3: 1981, p 2-96.
35. Plotkin, E.U, 1981. "Methanol dehydrogenase bioelectrochemical fuel cell and alcohol detector".-- Biotechnology and Bioengineering. 3: 1981, p 271-308.
36. Primrose, J, "Molecular Biotechnology".-- England: Balkwell Scientific; 1991.-- pag. 541.
37. Quintero, Ramirez Rodolfo, "Ingeniería Bioquímica".-- México: Alhambra, 1986.-- pag. 322.
38. Reed, Gerald, "Enzymes in food processing".-- N.Y.: Academic; 1983.-- pag. 370.
39. Sanger, F, "DNA Sequencing with chainterminating inhibitors".-- Proceeding of the national Academy of Science. 74: 1977, p 5463-5467.
40. Smith, M, "Site-directed mutagenesis Trend in".-- Biochemical Sciences. 7: 1982, p 440-442.
41. Stryer, L, "Bioquímica".-- México: Reverte; 1986.-- pag. 562.

42. Trevan, M.D, "*Immobilized Enzymes*".-- Chichester.-- England: 1980.-- pag. 197.
43. Van Brunt, J, "*Protein architecture, designing from the ground up*".-- *Biotechnology*. 4: 1986, p 226-238.
44. Weaver, J.C, "*Potential Impacts of physics and electronics on enzyme based analysis, in Applied*".-- *Biochemistry and Bioengineering*. 3: 1981, p 271-308.
45. Williams, B.L, and Wilson, K, "*Principles and Techniques of practical Biochemistry*".-- London: Ward Arnold; 1975.-- pag. 262.
46. Wingard, Lemuel, B, "*Enzyme Technology*".-- N.Y.: Academic; 1983.-- pag. 312.
47. Wiseman, "*Manual de Biotecnología de las Enzimas*".-- Zaragoza: Acribia; 1991.-- pag. 236.
48. Yulsi, P.L, "*Solubilization of enzyme in apolar solvents vía reverse micells*".-- *Biotechnology*. 4: 1986, p 153-160.