



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

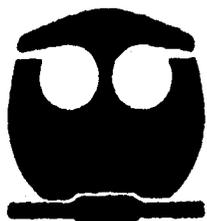
FACULTAD DE QUIMICA

ESTABILIDAD TERMICA DE  
B-GALACTOSIDASA EN UN SISTEMA  
DE REACCION NO ACUOSO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :  
FABIAN BLANCAS GUZMAN



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

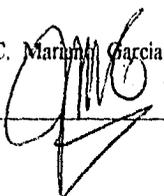
PRESIDENTE	PROF. AGUILAR CABALLERO RAUL
VOCAL	PROF. GALVEZ MARISCAL AMANDA
SECRETARIO	PROF. GARCIA GARIBAY JOSE MARIANO
1er. SUPLENTE	PROF. SILVA PORTILLO ANA LUISA
2do. SUPLENTE	PROF. FARRES GONZALES SARAVIA AMELIA Ma De Gpe

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA, FAC. DE  
QUIMICA, UNAM, LABORATORIO 314.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. ~~Mariano~~ Garcia Garibay.



---

SUSTENTANTE:

Fabián Blancas Guzmán.



## AGRADECIMIENTOS.

A Dios por permitirme llegar hasta donde estoy y darme los elementos para seguir adelante.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y de manera muy especial a la Facultad de Química.

Al M. en C. José Mariano García Garibay por sus consejos, enseñanzas, paciencia y tiempo para revisar este trabajo.

A mis amigos -que gracias a Dios son muchos y no me es posible escribir el nombre de todos-; por su apoyo y confianza.

A mi familia, en especial a mis hermanos.

A Erika y Andrés por representar los fines y los medios de mi superación y además por haber estado a mi lado en todos los momentos difíciles que sostuve durante estos últimos 5 años.

La fórmula de mi dicha:  
un sí, un no, una línea recta, un fin.

## INDICE

	Página.
INDICE.	i
RESUMEN.	ii
CAPITULO 1 INTRODUCCION.	1
CAPITULO 2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS.	4
CAPITULO 3 GENERALIDADES.	5
CAPITULO 4 MATERIALES Y METODOS.	15
CAPITULO 5 RESULTADOS.	21
CAPITULO 6 ANALISIS DE RESULTADOS.	40
CAPITULO 7 CONCLUSIONES.	50
CAPITULO 8 RECOMENDACIONES.	52
CAPITULO 9 BIBLIOGRAFIA.	54
APENDICE.	59

## RESUMEN

Se trabajó en la determinación de actividad de la enzima incubándola en 1-heptanol a diferentes tiempos (0-6 horas) y con tres porcentajes de agua adicional al 1-heptanol los cuales fueron: 5.4, 2.7 y 0.0. El rango de temperatura manejado fue de 37°C a 65°C.

La determinación de actividad se realizó mediante la hidrólisis del ONPG en fase acuosa, esta determinación de actividad residual fue la que nos permitió evaluar la estabilidad térmica de la enzima dentro del rango de temperaturas manejado.

Se comprobó que la estabilidad térmica de la  $\beta$ -galactosidasa en 1-heptanol es mayor comparada con la que presenta en fase acuosa, incluso a la temperatura óptima de la enzima.

Un resultado importante fue el hecho de que al no agregar agua adicional al medio orgánico (1-heptanol) la actividad residual de la enzima es mínima, inclusive a temperaturas bajas. A temperaturas por arriba de 37°C la temperatura de 45°C con el contenido de agua adicional de 5.4% resultaron ser las mejores condiciones de incubación para la estabilidad de la enzima sin embargo, a temperaturas por arriba de 50°C el contenido de agua del 5.4% resulta desfavorable para la estabilidad de la enzima lo que nos indica que el incremento de la temperatura provoca una disminución en el contenido de agua adicional necesario para una mayor estabilidad.

La desnaturalización de la enzima fue muy alta (mayor del 90%) cuando se trabajó con temperaturas de 60 y 65°C.

De estos resultados se puede inferir la hipótesis de que el contenido de agua de la fase orgánica que permite una mayor estabilidad térmica de la enzima es dependiente de la temperatura de incubación, lo cual hace suponer que un cierto grado de hidratación de esta proteína favorece su estabilidad a temperaturas por arriba de 37°C.

Este trabajo se encaminó a encontrar la estabilidad térmica de la  $\beta$ -galactosidasa para su aplicación a futuras reacciones de síntesis de alquilgalactósidos en sistemas de una ó de dos fases.

## INTRODUCCION.

Las enzimas son proteínas que poseen actividad catalítica y un alto grado de especialización. Poseen un grado de especificidad elevado respecto a sus sustratos, aceleran reacciones químicas específicas sin formación de subproductos y actúan en disoluciones acuosas diluidas en condiciones muy suaves de temperatura y de pH.

Dentro de la clasificación de las enzimas existe un grupo el cual recibe el nombre de *hidrolizas*. Son las responsables de la ruptura hidrolítica de uniones y su nombre común se forma mediante el agregado del sufijo *asa* al nombre del sustrato; por ejemplo: lipasas, proteinasas, amilasas, glucosidasas, etc. (Lehninger 1991).

En los últimos años se ha dado una gran importancia a las reacciones de alcoholisis de las glicosidasas. Este tipo de reacciones da como resultado la síntesis de alquil-glicósidos en las cuales la parte alquilo está dada por la cadena de un alcohol.

En las reacciones anteriores el alcohol actúa como nucleófilo y como disolvente por lo que este tipo de reacciones se llevan a cabo en medios orgánicos donde el contenido de agua puede ser muy bajo lo que da a las enzimas ciertas características que alteran su comportamiento general en sus condiciones normales, es decir, en medios acuosos.

Una de las características que se mejoran en reacciones en fase orgánica es la estabilidad térmica de la enzima ya que debido a que la flexibilidad de la misma se ve disminuida existe la posibilidad de trabajar a temperaturas más altas sin que

la enzima se desnaturalice, es importante aclarar que el aumento en la estabilidad térmica es diferente para cada enzima y disolvente utilizado. (Klibanov 1989).

En este trabajo se busca hacer un análisis de la estabilidad térmica de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* usando como disolvente 1-heptanol el cual es un alcohol de cadena larga, con el propósito de establecer que tanto se incrementa la estabilidad térmica de la enzima en este sistema. También se desea saber qué tanto afectan las condiciones del sistema de reacción (agua y temperatura) sobre la actividad de la enzima.

El uso de enzimas en reacciones de síntesis esta tomando cada vez mayor importancia, por lo que cada vez son más los productos que se obtiene a partir de este procedimiento.

Los alquil- $\beta$ -galactósidos poseen características de surfactantes y en contraparte con los obtenidos por síntesis química presentan biodegradabilidad, y pureza estereoquímica ya que no se obtienen mezclas racémicas como sucede en el caso de la síntesis química. Además la síntesis por métodos químicos es complicada pues requiere de la protección y desprotección de algunos grupos. (Stevenson 1993).

Debido a todas las ventajas que presentan las reacciones de síntesis enzimática enumeradas en el siguiente capítulo y a la enorme gama de posibilidades para obtener diversos productos por este medio se deben hacer numerosas investigaciones para dilucidar mejor este tipo de reacciones que tiene un enorme potencial.

Este tipo de reacciones presenta un nuevo panorama de aplicación dentro del campo de la biotecnología.

Desde el punto de vista industrial, existe un gran potencial para estos compuestos como surfactantes y tensoactivos si se utilizan como aceptores alcoholes hidrofóbicos. Son utilizados compuestos formados por carbohidratos y cadenas hidrocarbonadas como biosurfactantes en la industria petrolera, en la industria química (Van Dyke et al 1991), y en las industrias alimentarias, farmacéuticas y de cosméticos (Mc Evily y Zacks; Van Dyke et al 1991).

## HIPOTESIS.

En disolventes orgánicos las enzimas presentan ciertas características que alteran su comportamiento general en condiciones normales (medios acuosos), una de las características que se altera es la estabilidad térmica, la cual aumenta debido a que el disolvente orgánico ejerce mayor rigidez a la estructura de la enzima lo que provoca una mayor estabilidad en la conformación catalítica al ser expuesta a temperaturas por encima de su temperatura óptima en fase acuosa.

## OBJETIVOS.

### 2.1 Objetivo principal.

-Medir la estabilidad térmica de la  $\beta$ -galactosidasa en 1-heptanol, dentro del contexto de reacciones de alcoholisis.

### 2.2 Objetivos particulares.

- Observar como varía la actividad residual a diferentes temperaturas de incubación.
- Observar como varía la estabilidad modificando el contenido de agua en el medio.
- Observar la dependencia que existe entre la cantidad de agua y el aumento de la temperatura con relación a la estabilidad de la enzima en el sistema

## GENERALIDADES.

### 3.1 Enzimología no acuosa.

La enzimología no acuosa se ha desarrollado en los últimos años como una herramienta en las reacciones de síntesis (Blinkovsky 1992).

Anteriormente se consideraba que el agua era el único medio donde se expresaba la actividad enzimática por ser el disolvente universal y elemento indispensable para la vida. Pero es un disolvente pobre para muchas aplicaciones industriales, por ejemplo, muchos compuestos orgánicos de interés comercial son poco solubles en agua.

Este tipo de reacciones ofrece una serie de ventajas tales como:

- 1) Incremento de la solubilidad de sustratos no polares.
- 2) Desplazamiento del equilibrio termodinámico en favor de la síntesis sobre la hidrólisis.
- 3) Posibilidad de efectuar las reacciones enzimáticas a temperaturas altas sin que la enzima se desnaturalice.
- 4) La inmovilización no es necesaria por que las enzimas son insolubles en disolventes orgánicos, por lo tanto la recuperación de las enzimas puede ser mediante filtración simple.

5) Eliminación de contaminación microbiana.

6) Rendimientos altos y fácil recuperación del producto.

7) Selectividad enantiomérica (Dordick 1991).

La idea de que las enzimas no toleraban soluciones no acuosas y que por consiguiente resultaban inadecuadas como catalizadores en dichas circunstancias estaban basadas en antiguas observaciones; disolventes orgánicos miscibles en agua 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 (Gacesa y Hubble 1990).

En las últimas dos décadas, un buen número de transformaciones catalizadas por enzimas han sido estudiadas en disolventes orgánicos, particularmente aquellas que incluyen sustratos y/o productos que son esencialmente insolubles en agua (Klibanov 1989).

### **3.2 Efecto del disolvente.**

El uso de disolventes orgánicos es altamente ventajoso sobre soluciones acuosas en reacciones que involucran reactivos con baja solubilidad en agua. Lo mismo ocurre cuando el agua participa como reactivo (reacciones de hidrólisis) permitiendo una modificación radical sobre el equilibrio en favor de las reacciones de síntesis (Bárzana y López-Munguía 1993).

Las enzimas presentan una reducción significativa de su flexibilidad en disolventes orgánicos en comparación con los medios acuosos porque la constante dieléctrica del agua es generalmente más alta y la fuerza de interacción electrostática entre los residuos de aminoácidos es mayor en medios orgánicos que en agua (Blinkovsky 1992).

Volkin et al (1991) han demostrado que la resistencia térmica de las enzimas en disolventes anhidros se incrementa con disolventes hidrofóbicos.

El hecho de colocar a las enzimas en disolventes orgánicos implica mayor rigidez en la estructura lo que da como resultado algunas propiedades explotables, entre ellas el incremento de la estabilidad térmica.

La especificidad del sustrato y la eficiencia catalítica depende de la capacidad de la enzima para usar la energía libre de unión con el sustrato.

Existe competencia de unión sustrato-enzima vs. sustrato-disolvente (Dordick 1991).

El hecho de reemplazar agua con disolventes orgánicos puede muchas veces ser acompañado por un decremento en la eficiencia catalítica. Este efecto es provocado por un incremento en la constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) lo que implica menos afinidad por el sustrato (Blinkovsky 1992).

### **3.3 El papel del agua.**

El agua asociada se encuentra fuertemente enlazada a la estructura de la proteína por puentes de hidrógeno lo que le confiere la flexibilidad necesaria para atrapar el reactivo y liberar el producto (Bárzana y López-Munguía 1993).

El agua es necesaria para que la enzima mantenga su conformación activa y la cantidad de agua requerida para que la enzima actúe catalíticamente es extremadamente baja del orden de una monocapa (Klibanov 1989).

La cantidad de agua retenida por una enzima depende de las propiedades del disolvente; el agua liberada puede relacionarse directamente con la polaridad del disolvente, es decir, con un disolvente hidrofóbico la extensión de agua retenida es menor y viceversa (Blinkovsky 1992).

El agua también participa en la termoinactivación de la enzima, ya que al ser más flexibles las proteínas hidratadas pierden con mayor facilidad su conformación catalítica al ser calentadas.

Por otra parte la carencia de agua aumenta el grado de rigidez de las moléculas de la enzima y esto puede tener ciertos efectos sobre su especificidad.

Muchas de las enzimas que han sido utilizadas en sistemas de disolventes orgánicos son hidrolasas. Claramente si la concentración de agua es baja y se dispone de otros nucleófilos adecuados (alcoholes, aminas, tioles, etc) ocurrirán nuevas reacciones (Gacosa y Hubble 1990).

### **3.4 Aplicaciones.**

Un tipo de compuestos con aplicación en alimentos y factibles de ser producidos enzimáticamente en disolventes orgánicos son los ésteres. Tal es el caso de aromas y surfactantes producidos en reacciones catalizadas por lipasas.

Los surfactantes de origen enzimático, en contraparte con los obtenidos por síntesis química presentan baja toxicidad, biodegradabilidad y la posibilidad de ser obtenidos a partir de sustratos baratos.

Otra aplicación de interés se encuentra en la revalorización de aceites de baja calidad comercial y la producción de compuestos usados en la elaboración de edulcorantes.

Usando lipasas en disolventes orgánicos se pueden obtener grasas similares a las del cacao a partir de aceites baratos como el de palma (Bárzana y López-Munguía 1993).

La síntesis asimétrica es muy evidente en la catálisis enzimática, particularmente en las reacciones catalizadas por hidrolasas tales como proteasas y lipasas. Las reacciones más importantes catalizadas por enzimas en síntesis orgánica asimétrica incluyen: acilación de alcoholes, síntesis de péptidos, síntesis de lactonas e interesterificación.

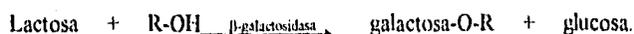
Otra aplicación es la síntesis de polímeros; existe un potencial de aplicación interesante de lipasas y proteasas en medios orgánicos como la enantioselectividad o regioselectividad en la síntesis de polímeros ópticamente activos.

Otro punto importante es la síntesis químico-enzimática que se caracteriza por la alta selectividad y velocidad de reacción que provee la catálisis enzimática, así como la gran especificidad del sustrato comparada con la que proporciona la tradicional catálisis química.

### 3.5 Reacciones de Alcohólisis.

La reacción de alcohólisis puede considerarse un caso particular de las transglucosidaciones, donde el aceptor es un alcohol distinto a un carbohidrato para la producción de alquil-glicósidos.

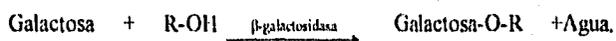
La alcohólisis para la  $\beta$ -galactosidasa se ilustra con la siguiente reacción:



Otro fenómeno relacionado y presentado por las carbohidrasas, es el de las reacciones de síntesis por el método de hidrólisis inversa o condensación (Toone et al 1989; Cote y Tao 1990; Nilsson 1991).

En estos casos utilizando como sustrato el monosacárido reconocido por el sitio activo, la enzima lo une al aglicón o aceptor, el cual puede ser otra molécula de azúcar o bien un alcohol.

En 1912 se reportó la síntesis de alquil-galactósidos con  $\beta$ -galactosidasa (Wallenfels y Malhotra 1961), partiendo de galactosa como sustrato, etanol y propanol como aceptores (aglicones). La siguiente reacción ejemplifica la hidrólisis inversa:



La siguiente tabla enlista las enzimas que han sido utilizadas en reacciones de alcohólisis con resultados positivos en los últimos años. Los estudios en su mayoría, incluyendo reportes recientes, se han hecho a nivel exploratorio, es decir, para estudiar la factibilidad de la reacción con diferentes enzimas, sustratos y aceptores. Las enzimas que han sido estudiadas con mayor detalle son la  $\beta$ -xilosidasa, la  $\beta$ -glucosidasa y la  $\beta$ -galactosidasa.

Tabla 1. Enzimas utilizadas en reacciones de alcoholisis de acuerdo a reportes recientes en la literatura.

Enzima.	Fuente	Sustrato	Aceptor	Ref <sup>1</sup>
$\beta$ -xilosidasa	<i>A. niger</i>	xilobiosa	alcoholes C <sub>1</sub> -C <sub>8</sub>	a,b
$\alpha$ -glucosidasa	arroz levadura	maltosa	alcoholes C <sub>1</sub> -C <sub>8</sub>	b
		maltosa	alcoholes C <sub>1</sub> -C <sub>8</sub>	b
$\beta$ -glucosidasa	almendra	celobiosa	alcoholes C <sub>1</sub> -C <sub>8</sub>	b,c
		metil- $\beta$ -gluc.	alcoholes C <sub>5</sub> -C <sub>8</sub>	c
		glucosa	alcoholes C <sub>5</sub> -C <sub>12</sub>	c,d
	<i>A. niger</i> <i>T. viride</i>	celobiosa	alcoholes C <sub>1</sub> -C <sub>8</sub>	b
		celobiosa	heptanol, octanol	e
$\beta$ -galactosidasa	<i>E. coli</i>	lactosa	alcoholes C <sub>1</sub> -C <sub>8</sub>	b
			mono,dioles C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub>	f
	<i>A. niger</i> <i>A. niger</i> <sup>3</sup>	lactosa metil- $\beta$ -galac	L-serina prot. <sup>2</sup>	g
			alcoholes C <sub>1</sub> -C <sub>8</sub> hexanol	b h
Invertasa	levadura	sacarosa fructuosa	alcoholes C <sub>1</sub> -C <sub>3</sub> alcoholes C <sub>1</sub> -C <sub>3</sub>	i i
$\alpha$ -glucosidasa	café	rafinosa	L-serina prot. <sup>2</sup>	g
$\alpha$ -manosidasa	leguminosa	manosa	D,L-ser; D,L-Thr	j
$\alpha$ -N-acetilga- lactosamidasa	higado de bovino	N-acetilga- lactosamina	D,L-ser; D,L-Thr	j
Homogeneizado celular de <i>Sulfolobus solfataricus</i>		fenil- $\beta$ -glic. y lactosa	alcoholes C <sub>1</sub> -C <sub>8</sub>	k

<sup>1</sup>Referencias: a) Shinoyama et al 1988; b) Shinoyama y Yasui 1988; c) Vulfson et al 1990a; d) Vulfson et al 1990b; e) Shinoyama et al 1991a; f) Crout et al 1990; g) Cantacuzene y Attal 1991; h) Beccher et al 1990; y) Selisko et al 1990; j) Johansson et al 1991; k) Trincone et al 1991.

<sup>2</sup>Serina protegida en los grupos amino y carboxilo.

<sup>3</sup> $\beta$ -galactosidasa de *A. niger* modificada químicamente con polimeros de polietilenglicol.

### 3.6 Síntesis de Alquil-galactósidos.

El uso de enzimas para sintetizar alquil-glicósidos ha tomado un interés considerable en los últimos años. Recientemente la Compañía Henkel realizó una inversión de \$120 millones de dólares en la construcción de una planta para la síntesis de alquil-glicósidos con una producción de 25,000 Ton/año para ser utilizados como surfactantes (Ainsworth 1992).

La enzima  $\beta$ -galactosidasa hidroliza la lactosa (4-O- $\beta$ -galactopiranosil- $\alpha$ -D-glucosa) liberando glucosa y formando un complejo (enzima-sustrato) con el residuo galactosil.

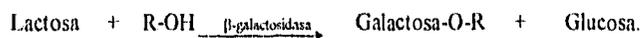
El complejo galactosil-enzima es entonces hidrolizado por agua para liberar galactosa. Esto sucede claramente cuando se utilizan alcoholes solubles en agua, donde el sistema es una mezcla de alcohol y agua en distintas proporciones.

Cuando se utilizan alcoholes hidrofóbicos como aceptores, las reacciones ocurren necesariamente en sistemas de dos fases, y dado que el producto se solubiliza en el propio alcohol se minimiza el problema de hidrólisis del alquil-galactósido. Sin embargo, las reacciones de alcoholólisis con alcoholes insolubles han sido muy poco estudiadas (Shinoyama et al 1988; Vulfson et al 1990).

Se sabe que cuando está formado el complejo galactosil-enzima puede ser interceptado por otros nucleófilos (aceptores) además del agua. Varios alcoholes pueden actuar como aceptores y producir alquil- $\beta$ -galactósidos por transgalactosilación. David et al 1993 utilizaron la lactasa ( $\beta$ -D-galactósido galactohidrolasa) para sintetizar alquil- $\beta$ -D-galactopiranosidos de varios alcoholes usando lactosa como donadora del grupo galactosil.

La síntesis de alquil- $\beta$ -xilósidos (Shinoyama et al 1988) y alquil- $\beta$ -glucósidos (Vulfson et al 1990) ha sido investigada y probada en presencia de varios alcoholes desde metanol hasta alcoholes de cadena larga como octanol. A este tipo de reacciones en las cuales el alcohol es un aceptor se les conoce con el nombre de alcohólisis.

La alcohólisis para la  $\beta$ -galactosidasa se ilustra con la siguiente reacción:



La obtención de estos productos fue al principio por el método de síntesis química, pero resultó muy complicado por la necesidad de protección y desprotección de algunos grupos además, los rendimientos obtenidos eran bajos.

La formación de los anómeros  $\alpha$  y  $\beta$  fue también una desventaja en esta síntesis.

## MATERIALES Y METODOS.

### 4.1 Enzima.

La enzima utilizada en este trabajo fue  $\beta$ -galactosidasa proveniente de *Escherichia coli* (E.C. 3.2.1.23) liofilizada y de alta pureza grado VIII (Sigma Chemical Co. St Louis, MO).

La enzima fue suspendida en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 y a una concentración de 0.1M.

La actividad final de la enzima fue de 1000U/ml.

### 4.2 Reactivos.

El alcohol que se utilizó como fase orgánica en la cual se incubó la enzima fue 1-heptanol aprox 99% grado reactivo de (Sigma Chemical Co. St Louis MO).

Se utilizó para la determinación de actividad residual orto-nitrofenol- $\beta$ -galactopiranosido ONPG (Sigma Chemical Co. St Louis MO) disuelto en solución amortiguadora de fosfatos y con una concentración de 0.034M.

Solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.0, 0.1M).

Para la realización de la curva patrón se utilizó orto-nitrofenol ONP (Sigma Chemical Co. St Louis MO).

#### 4.3 Termoestabilidad.

La estabilidad térmica de la enzima se probó en un rango de temperatura que va desde 37°C hasta 65°C y se trabajó en un medio de una sola fase (orgánica) la cual esta dada por el alcohol de cadena larga 1-heptanol.

La preparación de la mezcla de la solución enzimática en el 1-heptanol se realizó de la siguiente manera:

20ml de 1-heptanol.
+
0.1ml de enzima.
+
Agua en diferentes proporciones.

La mezcla anterior se preparó en matraces de 50 ml con tapón de rosca y para obtener una perfecta homogeneización se utilizó un agitador magnético recubierto con teflón en el seno de la solución.

El 1-heptanol fue adicionado con pipeta graduada de 5 ml.

El volumen de agua y la enzima fueron adicionados con pipeta automática (Pipetman de Gilson).

La enzima que se adicionó tenía una actividad de 1000U/ml.

Para la adición de la cantidad de agua se manejaron 3 volúmenes diferentes esto con el fin de observar el efecto de la concentración de agua en la estabilidad térmica de la enzima.

Las cantidades de agua que se manejaron en el experimento fueron:

a) 0.95ml de agua, b) 0.47ml de agua y c) 0.00ml de agua.

Estos contenidos de agua van desde la cantidad necesaria para la saturación del 1-heptanol lo que representa el 5.4% y que corresponde a 0.95ml de agua, la mitad de la saturación que corresponde a 0.47ml de agua, hasta la no adición de agua en el medio

Posteriormente se procedió a la incubación de las reacciones anteriores en un baño a temperatura controlada (Hetto AT110 Denmark) en el rango de temperaturas antes mencionado tomando alícuotas de 1ml cada hora durante las seis primeras horas. Se consideraron únicamente las seis primeras horas debido a que se observó que en un intervalo de 24 horas es dentro de las seis primeras donde se observa una disminución drástica de la actividad residual de la enzima.

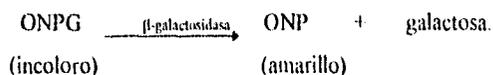
Cada alícuota tomada se colocó en un frasco bien cerrado y se mantuvo en refrigeración (4°C) para posteriormente determinar su actividad residual.

las temperaturas que se manejaron fueron las siguientes: 37, 40, 45, 50, 55, 60 y 65°C.

#### **4.4 Determinación de actividad.**

Se determinó la actividad residual de las muestras anteriores midiendo su actividad hidrolítica mediante la reacción de hidrólisis en solución acuosa del orto-nitrofenol- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) cuantificando la liberación de orto-nitrofenol (ONP) a 37°C, el cual es un compuesto colorido (amarillo) y se puede cuantificar en el espectrofotómetro en la región del espectro visible.

Modelo:



La mezcla de reacción fue la siguiente:

2.7ml de buffer
+
0.1ml de alícuota de solución heptanólica
+
0.2ml de ONPG.

Esta mezcla se incubó en un baño a temperatura controlada (37°C) con una moderada agitación previa. Se corrió la reacción durante 90 minutos realizando lecturas de actividad cada 15 minutos en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer lambda-2S) a una longitud de onda de 410nm, usándose como blanco agua destilada.

Los resultados obtenidos representan la actividad residual de la enzima después de haber sufrido el tratamiento térmico antes mencionado y se encuentran en términos de absorbancia, para convertirlos en unidades enzimáticas se corrió una curva patrón con orto-nitrofenol (ONP).

Se define como unidad enzimática la cantidad de enzima que libera una micromol de ONP por minuto a las condiciones de determinación de la enzima.

Posteriormente se realizó una determinación de actividad residual de la enzima incubada en medio acuoso a 37°C utilizando la técnica antes mencionada, con esto se pretende tener un parámetro de comparación de la actividad residual de la enzima en ambos medios (acuoso y orgánico).

Posteriormente se calcularon los porcentajes de actividad residual para saber el grado de inactivación de la enzima; esto se logró mediante la obtención de los valores de las pendientes de las gráficas "Cinética de producción de ONP" que se incluyen en el apéndice, el valor obtenido al tiempo cero para cada temperatura corresponde al 100% de actividad de la enzima y el valor va disminuyendo conforme el tiempo de incubación avanza.

Se determinaron los tiempos de vida media para la enzima en todas las temperaturas y concentraciones de agua ensayadas en el trabajo experimental.

El cálculo de tiempo de vida media se obtuvo partiendo de la gráfica "log % Actividad vs. Tiempo de incubación" en estas gráficas se obtiene una línea recta con pendiente negativa cuya ecuación es:  $\log \% \text{ Act.} = mt + b$  en donde:

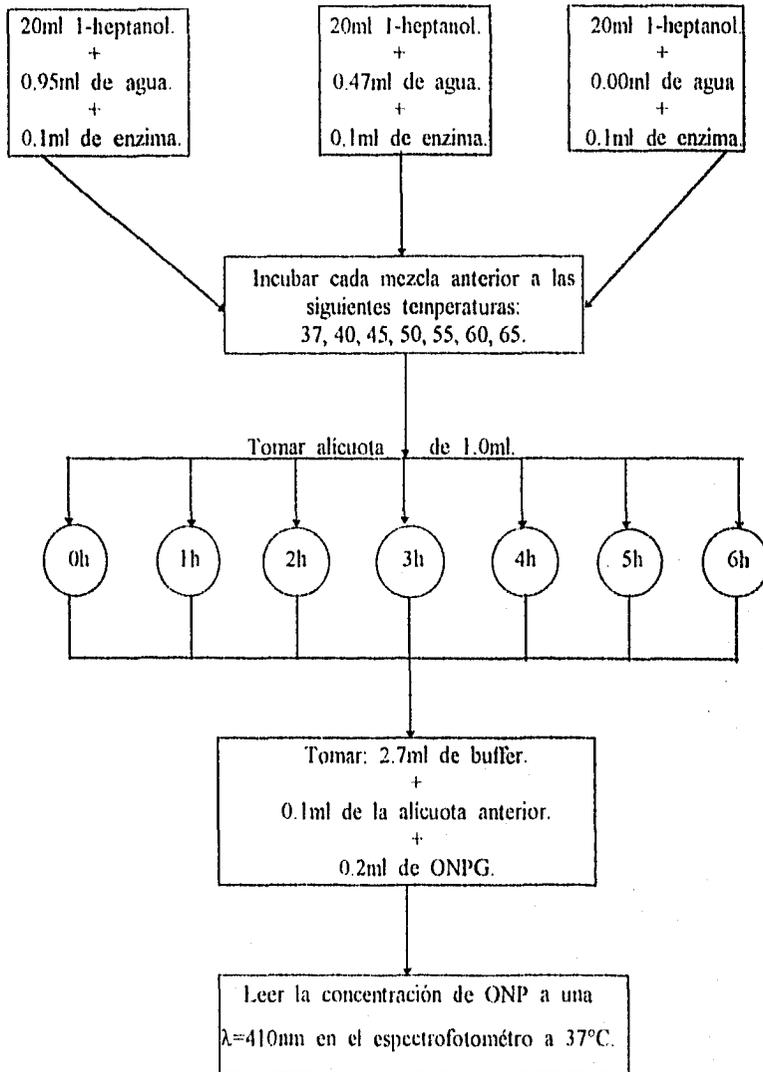
m= El valor de la pendiente.

t= Tiempo de incubación.

b= El valor de la ordenada al origen.

Cuando se asigna al log % Act el valor que corresponde al 50% de actividad se obtiene el consiguiente valor de tiempo expresado en minutos que corresponde al tiempo de vida media para cada caso.

#### 4.4 Diagrama de flujo del desarrollo experimental:



## RESULTADOS.

Se presentan los resultados del trabajo experimental en una serie de tablas y figuras con el fin de hacer más fácil el análisis de los mismos y también, para que su observación resulte menos tediosa.

Con el mismo fin se agrega un apéndice el cual contiene las gráficas de Cinética de producción de ONP por  $\beta$ -galactosidasa en todas las temperaturas analizadas y con los tres contenidos de agua con los que se trabajó.

Los resultados del trabajo incluyen:

-Tablas No. 1, 2, y 3: % de Actividad Residual.

-Tabla No. 4: Tiempos de vida media.

-Figura No. 1: Estabilidad Térmica de  $\beta$ -galactosidasa en agua y en 1-heptanol.

-Figuras No. 2, 3, 4, 5, 6, y 7: % Actividad Residual vs. Temperatura.

-Figuras No. 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14. Influencia de la cantidad de agua.

## TABLA No.1 Porcentaje de Actividad Residual.

Tiempo de incubación.	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
0 horas.	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1 hora.	92.5%	34.1%	43.7%	37.0%	32.9%	5.5%	8.0%
2 horas.	36.1%	28.5%	39.0%	25.0%	28.6%	4.3%	2.3%
3 horas.	34.6%	15.7%	30.5%	18.3%	9.7%	4.9%	2.1%
4 horas.	31.7%	13.3%	29.3%	10.6%	6.1%	3.3%	1.7%
5 horas.	9.1%	11.2%	19.0%	5.4%	3.2%	2.2%	2.0%
6 horas.	5.6%	10.5%	18.8%	10.5%	1.9%	1.4%	1.7%

contenido de agua=0.95ml.

## TABLA No.2 Porcentaje de actividad Residual.

Tiempo de incubación.	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
0 horas.	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1 hora.	56.7%	45.8%	34.5%	22.8%	21.1%	5.2%	5.9%
2 horas.	53.6%	42.3%	32.1%	20.0%	18.0%	6.3%	3.4%
3 horas.	50.6%	15.5%	24.1%	18.0%	14.8%	5.7%	2.6%
4 horas.	35.4%	10.6%	12.2%	13.1%	11.6%	3.7%	2.6%
5 horas.	31.2%	8.5%	12.1%	12.2%	10.3%	3.7%	1.5%
6 horas.	15.1%	8.3%	9.9%	9.1%	8.4%	2.8%	1.8%

contenido de agua= 0.47ml

## TABLA No.3 Porcentaje de Actividad Residual.

Tiempo de incubación.	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
0 horas.	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1 hora.	80.6%	19.4%	17.8%	10.7%	11.7%	3.0%	1.4%
2 horas.	64.0%	17.6%	12.9%	8.1%	7.8%	1.4%	1.5%
3 horas.	62.9%	4.1%	10.9%	6.5%	6.1%	2.1%	0.8%
4 horas.	57.3%	3.5%	6.0%	5.7%	4.6%	1.8%	1.1%
5 horas.	39.9%	2.9%	4.5%	4.0%	2.8%	0.7%	0.8%
6 horas.	5.8%	2.4%	4.7%	2.9%	2.5%	0.5%	0.4%

contenido de agua=0.0ml.

TABLA No.4 Tiempos de vida media de la enzima en 1-heptanol.

Temperatura.	0.95ml de agua.	0.47ml de agua.	0.00ml de agua.
37°C	1.86 horas	2.37 horas	4.11 horas
40°C	0.82 "	1.11 "	0.27 "
45°C	1.36 "	0.88 "	0.13 "
50°C	0.91 "	0.07 "	-----
55°C	0.97 "	0.12 "	-----
60°C	-----	-----	-----
65°C	-----	-----	-----

El tiempo de vida media se expresa en horas.

El tiempo de vida media de la enzima en agua=0.62h a 37°C

## Estabilidad Térmica de la Enzima en Agua y en 1-heptanol a 37°C

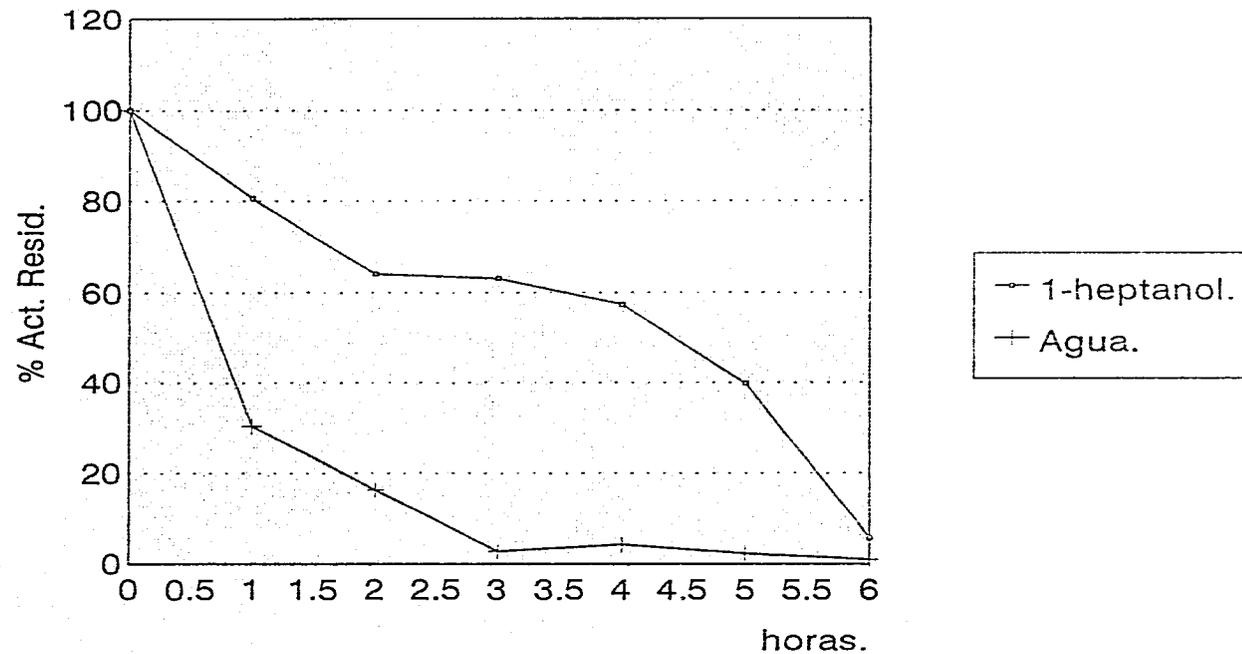


Figura No.1 La estabilidad de la enzima en 1-heptanol se realizó sin adición de agua.

## Actividad Residual vs. Temperatura.

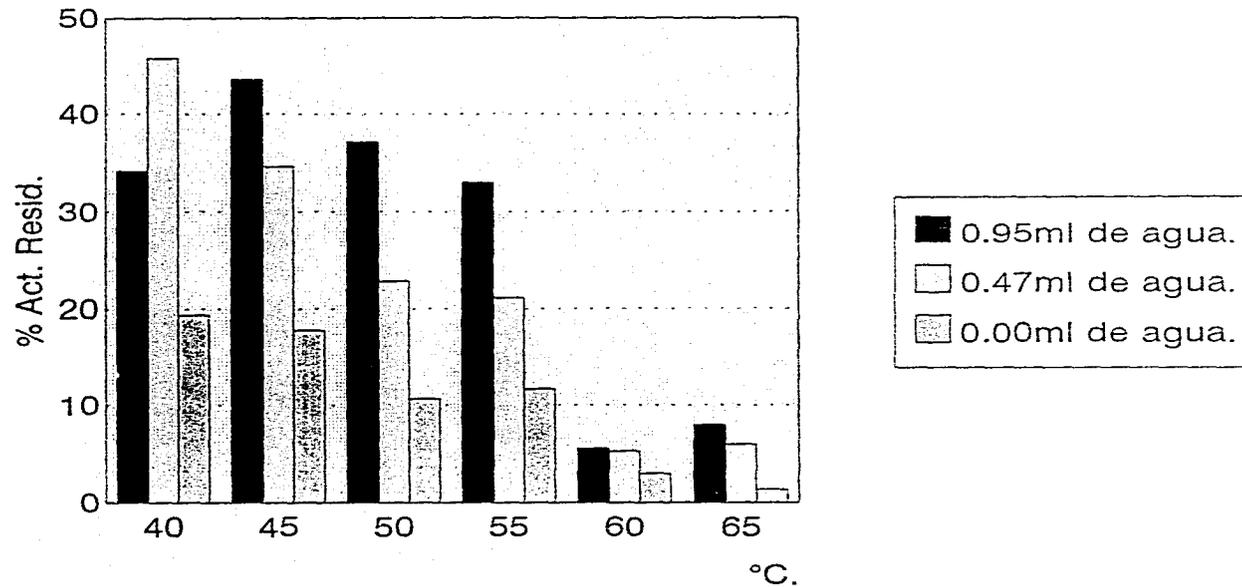


Figura No.2 Tiempo de incubación=1 hora.

## Actividad Residual vs. Temperatura.

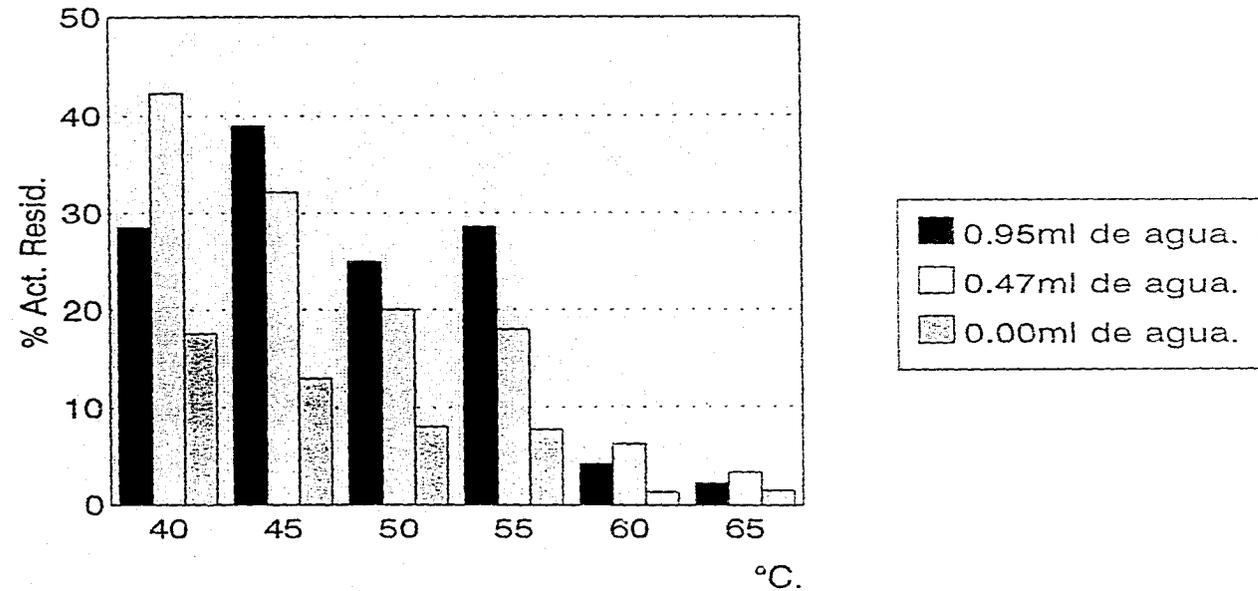


Figura No.3 Tiempo de incubación=2 horas.

## Actividad Residual vs. Temperatura.

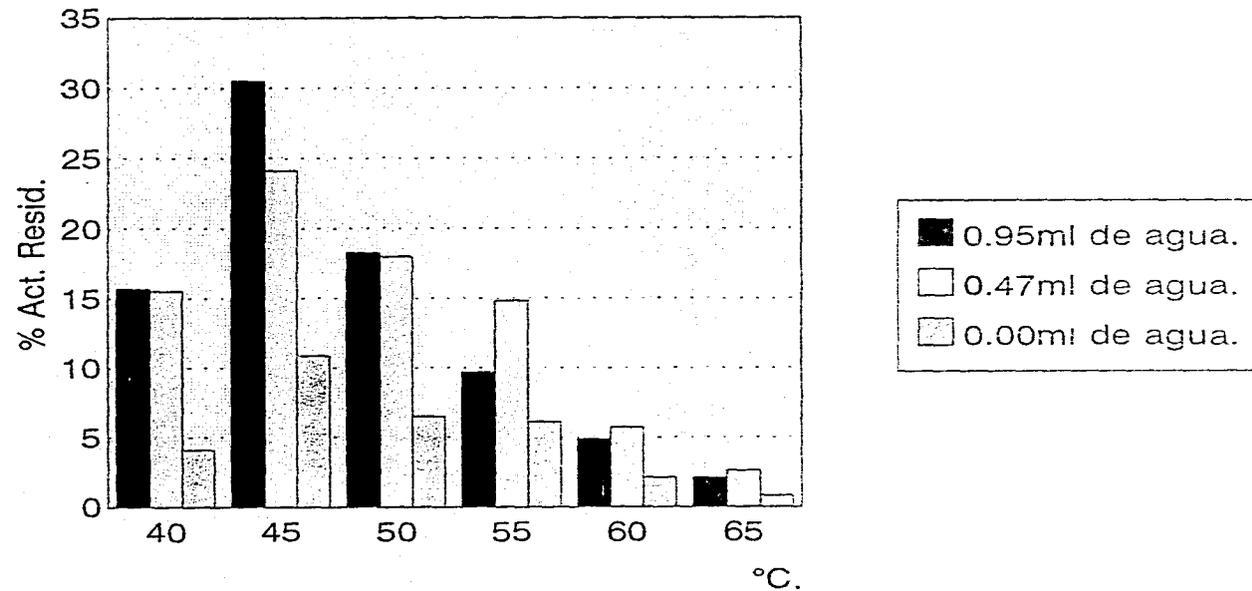


Figura No.4 Tiempo de incubación=3 horas.

## Actividad Residual vs. Temperatura.

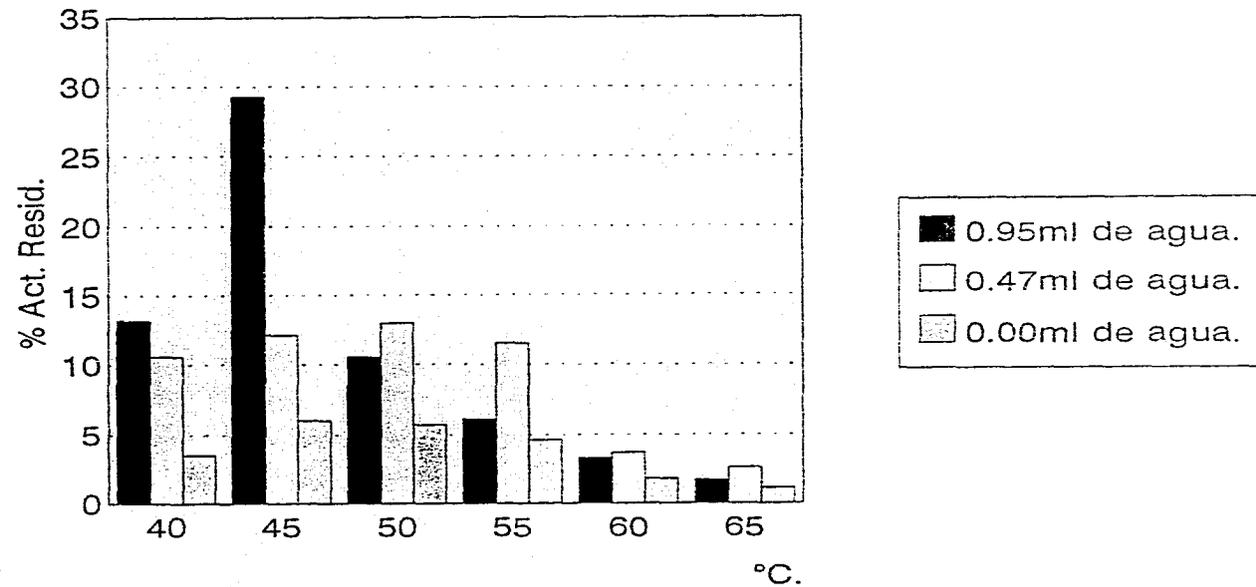


Figura No.5 Tiempo de incubación=4 horas.

## Actividad Residual vs. Temperatura.

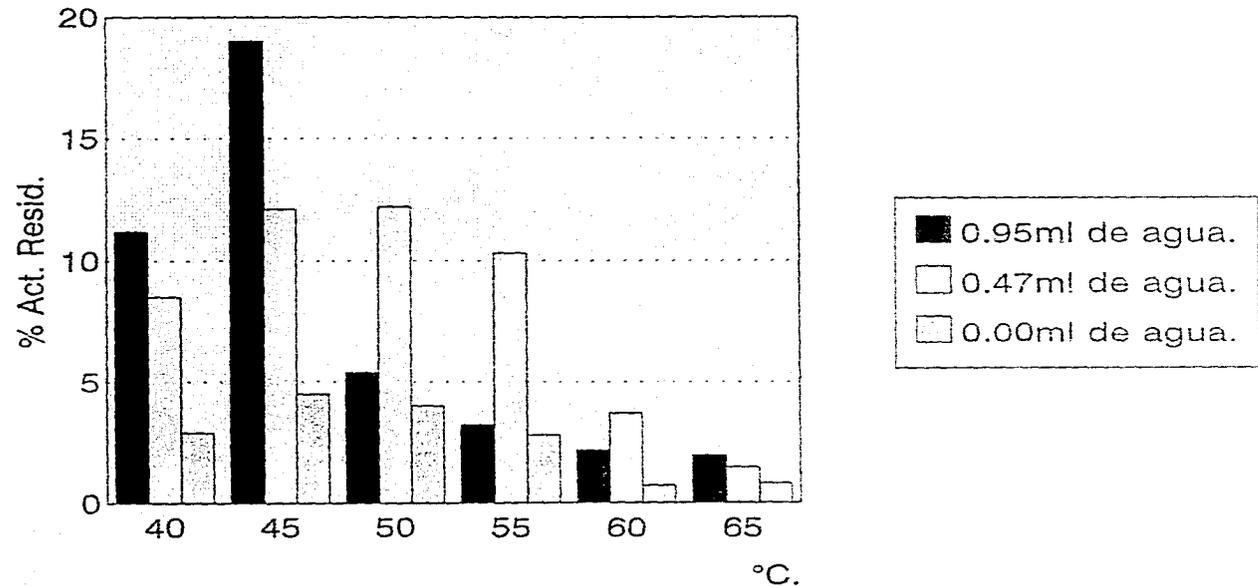


Figura No.6 Tiempo de incubación=5 horas.

## Actividad Residual vs. Temperatura.

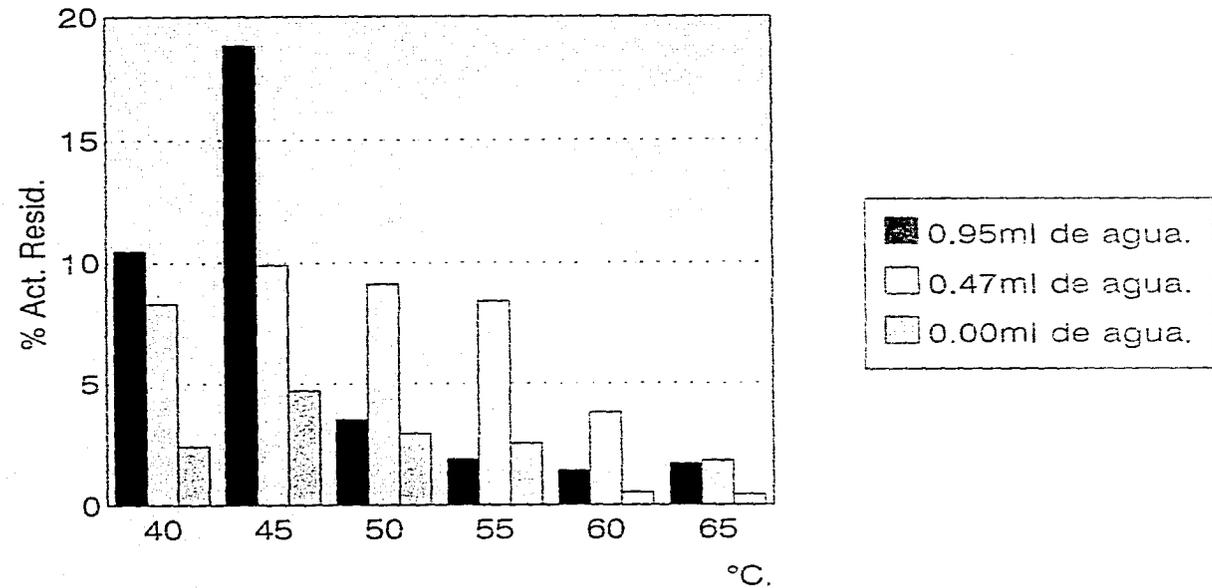


Figura No.7 Tiempo de incubación=6 horas.

## INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE AGUA.

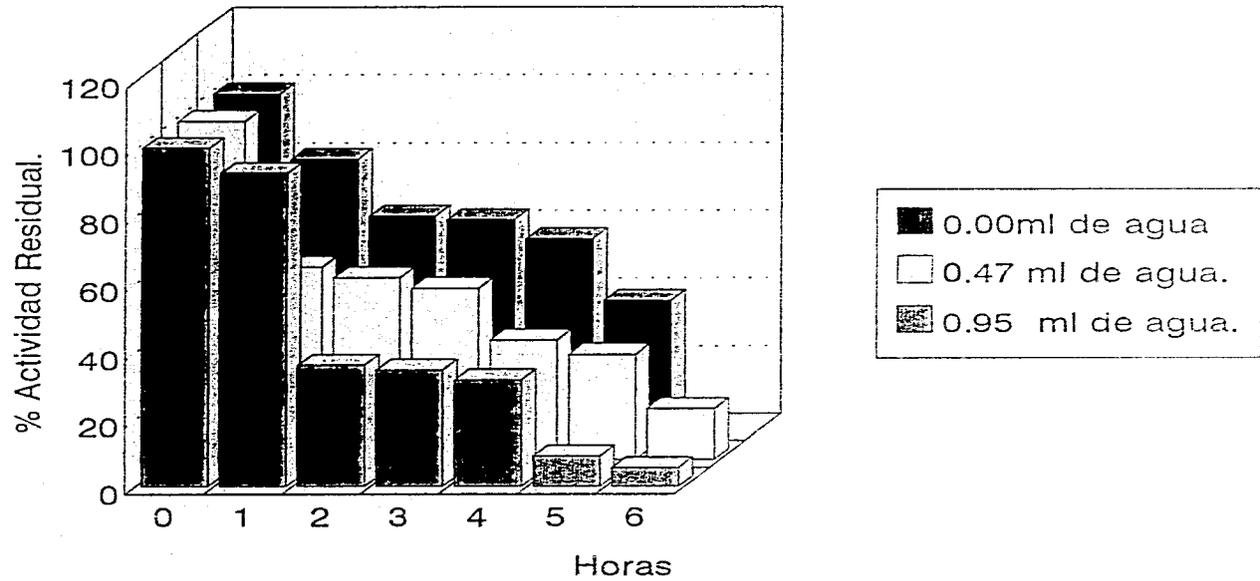


Figura No. 8 Temperatura de incubación=37°C

## INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE AGUA.

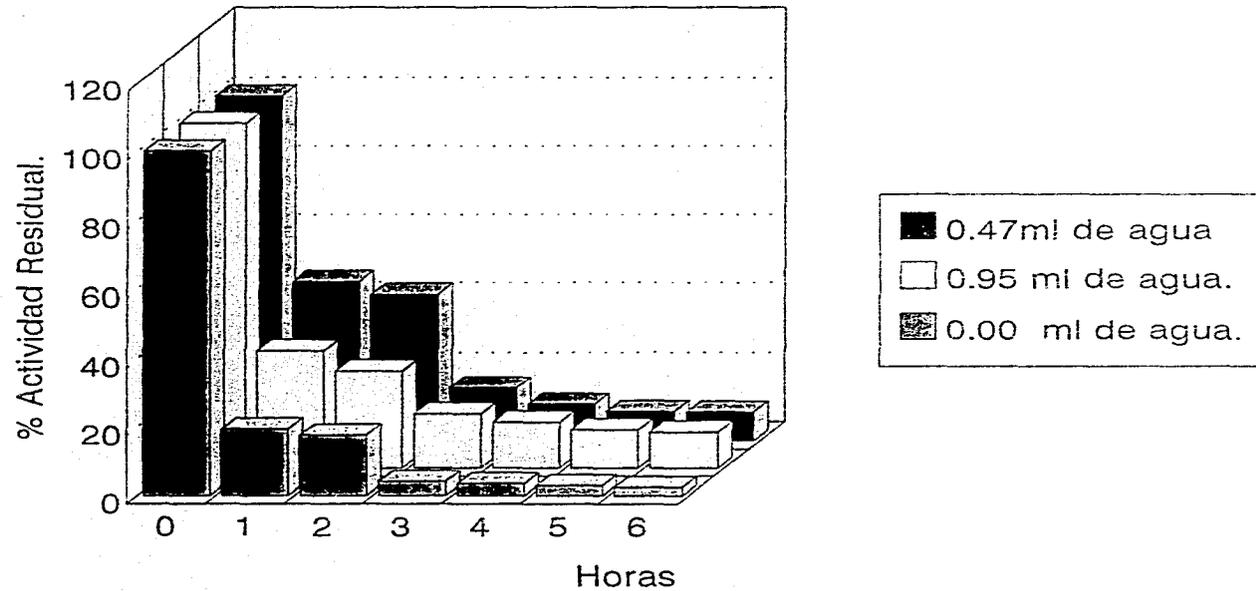


Figura No.9 Temperatura de incubación=40°C

## INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE AGUA.

---

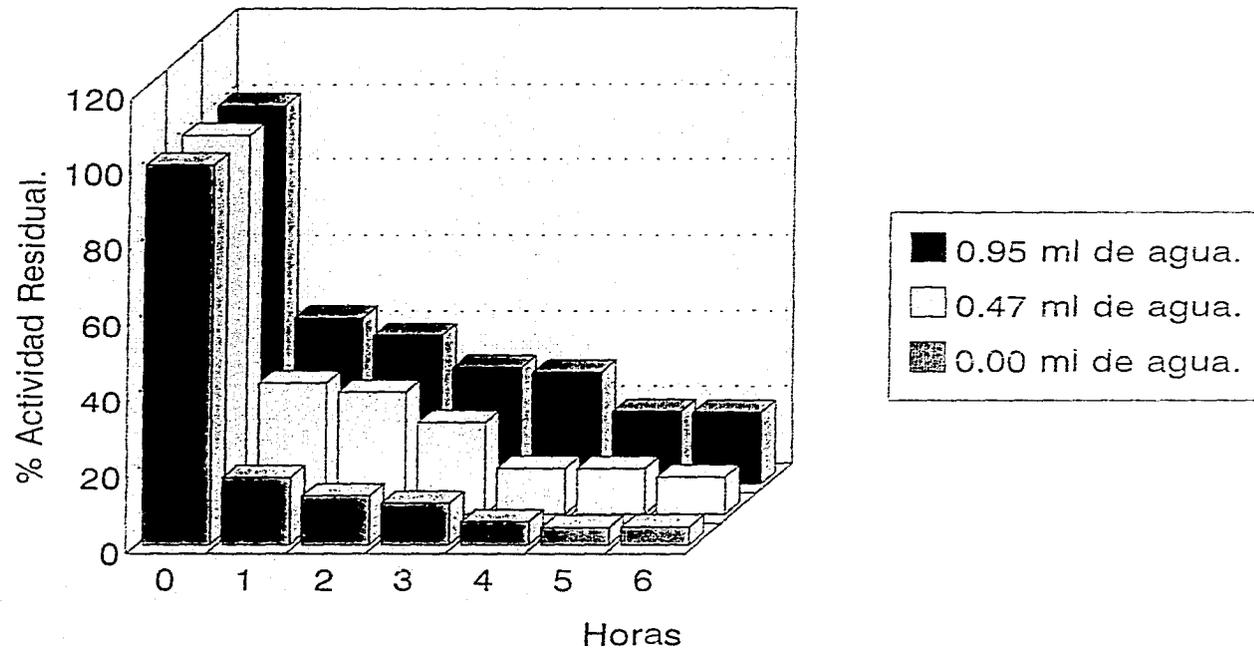


Figura No.10 Temperatura de incubación=45°C

## INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE AGUA.

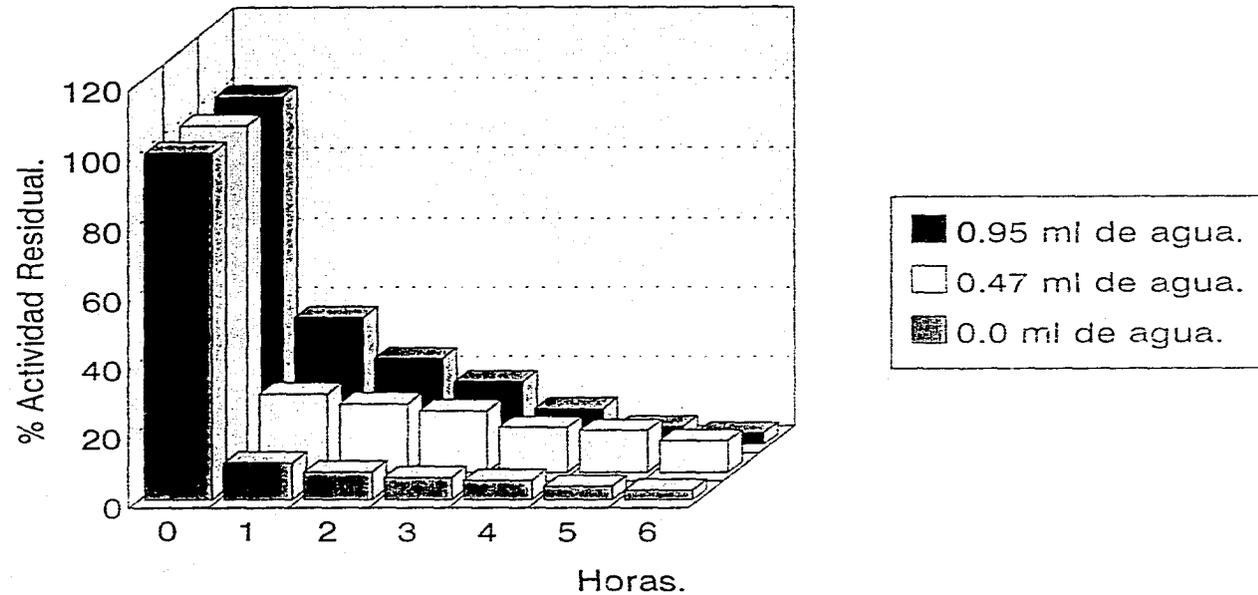


Figura No.11 Temperatura de incubación=50°C

## INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE AGUA.

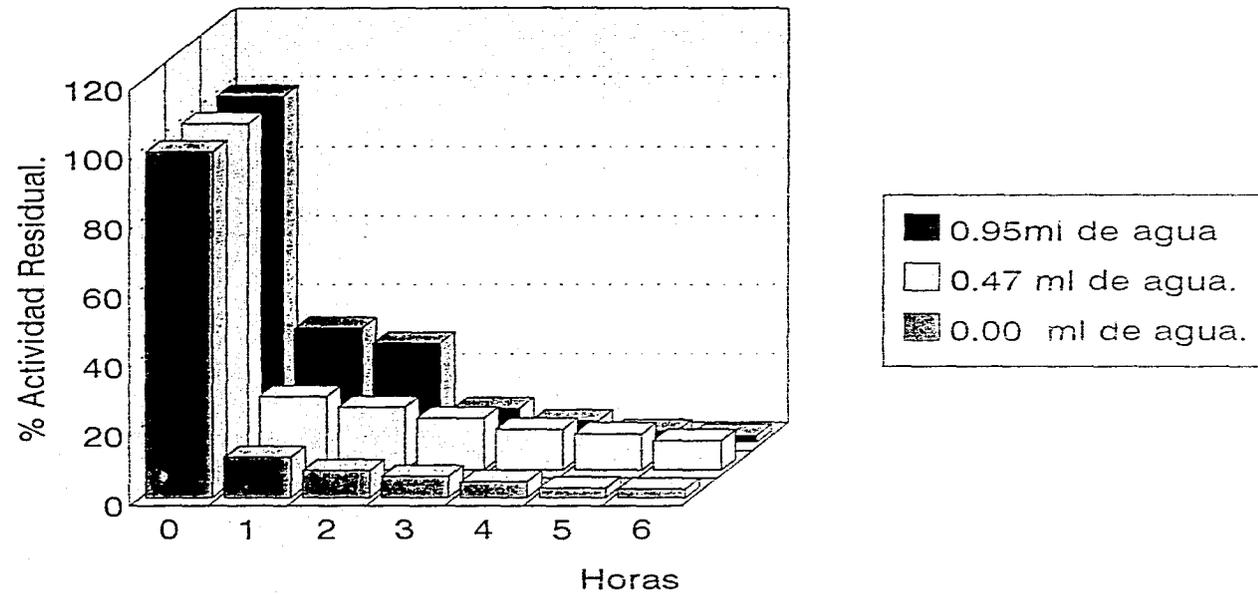


Figura No.12 Temperatura de incubación=55°C

## INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE AGUA.

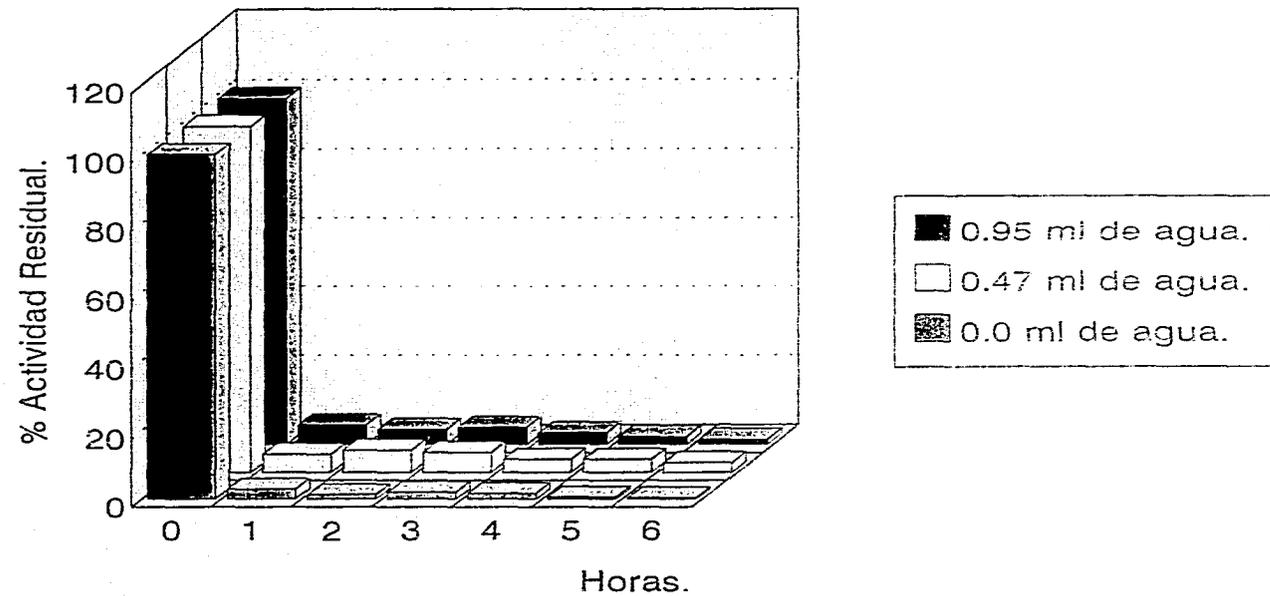


Figura No.13 Temperatura de incubación=60°C

## INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE AGUA.

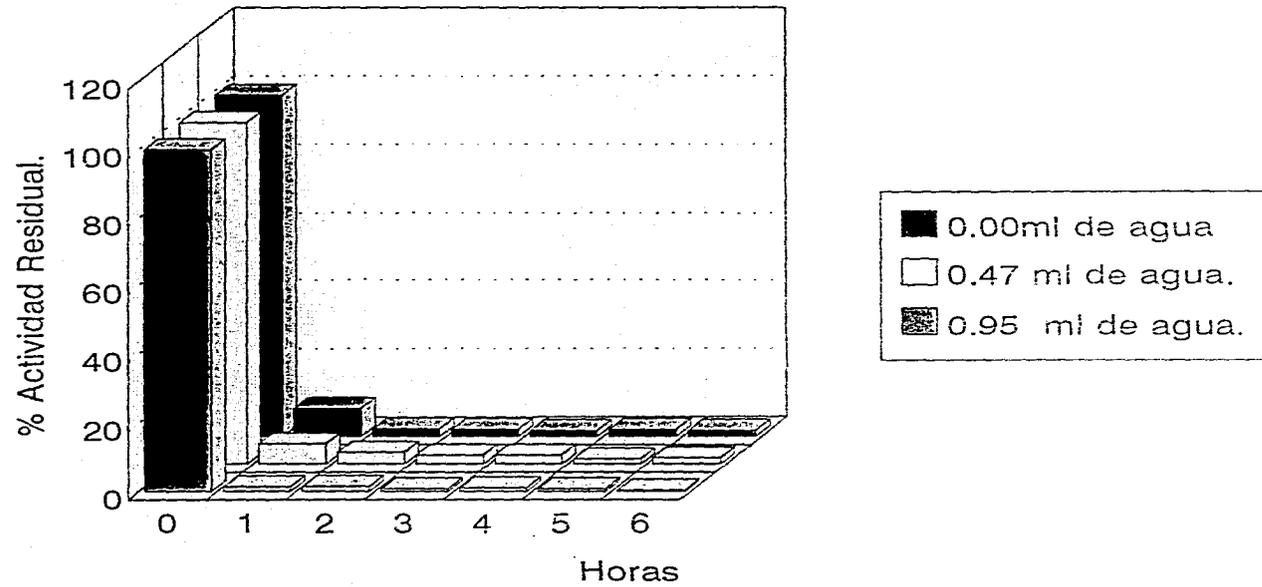


Figura No.14 Temperatura de incubación=65°C

## ANALISIS DE RESULTADOS.

### 6.1 Efecto de la temperatura.

El efecto de la temperatura se puede observar en las figuras de porcentajes de actividad residual vs. temperatura (Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7).

Estas figuras representan la variación del porcentaje de actividad residual a las diferentes temperaturas de incubación de la enzima y se presenta una figura para cada tiempo de incubación, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, y 6 horas de incubación de la enzima a las temperaturas de trabajo del experimento las cuales fueron 40, 45, 50, 55, 60, y 65°C.

Se partió de un estudio a 37°C que representa la temperatura óptima de la enzima utilizada con el fin de tener un parámetro de comparación con el resto de las temperaturas de estudio.

Las figuras a 37°C pueden observarse en el apéndice, se debe mencionar también que los porcentajes de actividad residual de todas las temperaturas trabajadas se obtuvieron tomando como 100% los resultados arrojados por el estudio a 37°C y al tiempo cero.

En la Figura No.2 podemos apreciar el porcentaje de actividad residual después de haber sometido la enzima al tratamiento térmico durante 1 hora.

Se puede observar que es en la temperatura de 40°C y con un contenido de agua de 0.47ml donde se alcanzó la mayor actividad residual, siendo esta igual a 45.8%, sin embargo, para las siguientes temperaturas (45 hasta 65°C) los porcentajes más altos son alcanzados por la muestra que contiene 0.95ml de agua

lo cual es contrario a lo esperado, Ya que la menor estabilidad se obtuvo con 0.0ml de agua adicionada.

Se observa claramente que para las temperaturas de 60 y 65°C la desnaturalización por efecto del tratamiento térmico es muy marcada; después de haber sometido a la enzima en estas temperaturas durante 1 hora el porcentaje de actividad residual no logra superar el valor de 10% en ninguna de las tres condiciones de contenido de agua manejadas.

También se observa al analizar la figura que las mejores temperaturas de incubación de la enzima son 40 y 45°C debido a que reportan la mayor actividad residual de la enzima, siendo la temperatura de 45°C la mejor temperatura en términos de estabilidad para el contenido de agua de 0.95ml.

Los menores porcentajes de actividad residual están dados para la muestra con un contenido de agua de 0.00ml en todas las temperaturas trabajadas. Esto probablemente implica que la enzima requiere un nivel mínimo de hidratación para tener mayor estabilidad térmica.

La Figura No.3 representa la incubación de la enzima durante 2 horas a las temperaturas de experimentación, esta figura presenta resultados semejantes a los obtenidos en la figura anterior, siendo los porcentajes de actividad residual menores a los obtenidos en la figura No.2, de igual forma podemos observar que a la temperatura de 40°C la muestra que presentó mayor actividad residual fue la que contenía 0.47ml de agua siendo su valor 42.3%.

Esta figura muestra que a las temperaturas de 60 y 65°C los porcentajes de actividad residual son muy bajos para las tres condiciones de agua manejadas, se observa también por primera ocasión que la muestra que contiene 0.47ml de agua presenta mayor actividad residual que los otros contenidos de agua manejados, esto nos indica que estas temperaturas resultan excesivas para la enzima.

En las temperaturas de 45, 50 y 55°C el mayor porcentaje obtenido corresponde a la muestra que contiene 0.95ml de agua.

Los mayores porcentajes de actividad para los tres contenidos de agua manejados se tienen en la temperatura de 45°C lo que nos indica que 45°C representa la mejor temperatura de incubación en términos de estabilidad a las 2 horas.

La figura No.4 muestra la incubación durante 3 horas. Se observa que 40°C no resulta ser una buena temperatura de incubación de la enzima en el 1-heptanol y claramente se observa que 45°C representa la mejor temperatura de incubación para la enzima en los tres contenidos de agua manejados en el experimento, destacando entre ellos el contenido de agua de 0.95 ml de agua, el cual representa un 30.5% de actividad residual.

La gráfica muestra como en las temperaturas más bajas (40, 45 y 50°C) el porcentaje de actividad residual más alto esta dado por la muestra con un contenido de agua de 0.95ml, pero en las temperaturas superiores (55, 60 y 65°C) el mayor porcentaje de actividad residual esta dado por la muestra con un contenido de agua de 0.47ml. Además se puede ver que en la temperatura de 50°C los porcentajes de actividad residual en los contenidos de agua de 0.95 y 0.47ml son prácticamente iguales. Esto nos refuerza la hipótesis de que se requiere un mínimo de agua para tener mayor estabilidad térmica de la enzima en 1-heptanol, pero este nivel de agua es variable dependiendo de la temperatura.

También se comprueba al igual que en las figuras anteriores que las temperaturas de 60 y 65°C ejercen un rápido efecto desnaturizante sobre la enzima.

La Figura No.5 muestra una incubación de la enzima de 4 horas. Se demuestra que la mejor temperatura de incubación para la enzima es 45°C para los contenidos de agua de 0.95 y 0.47ml resultando mejor para el contenido de agua de 0.95ml.

Para la muestra en la cual no se adicionó agua no se observa una disminución de la actividad residual muy grande en todas las temperaturas de incubación siendo, la mejor de ellas la que corresponde a 45°C y la menos favorable fue 65°C los porcentajes fueron 6.0 y 1.1% respectivamente.

En las temperaturas 50, 55, 60 y 65°C los mayores porcentajes de actividad residual son proporcionados por el contenido de agua de 0.47ml.

La figura No.6 representa una incubación de 5 horas. En esta gráfica se aprecian dos puntos que resultan importantes.

El primero de ellos es la confirmación de que 45°C representa la temperatura de mayor estabilidad de la  $\beta$ -galactosidasa en el 1-heptanol cuando el medio se encuentra saturado, es decir, conteniendo 5.4% de agua que representan 0.95ml adicionales; esto puede observarse de manera clara en la figura.

El segundo punto importante en la gráfica es que a partir de la temperatura de 50°C se da una disminución en la estabilidad de la enzima y la muestra que presenta la mayor estabilidad al tratamiento térmico es la que tiene un contenido de agua de 0.47ml. La figura muestra que es en 50°C donde se da la temperatura de máxima estabilidad para la  $\beta$ -galactosidasa en 1-heptanol con un contenido de agua de 0.47ml.

Para una temperatura de 55°C también se observa mayor estabilidad en el contenido de agua que corresponde a 0.47ml en comparación con los otros dos contenidos de agua manejados en el experimento.

Para las temperaturas de 60 y 65°C no hay cambios significativos con los tres contenidos de agua manejados, es decir, la desnaturalización enzimática es del orden de 95% ó mayor en las tres muestras.

Por lo que respecta a la muestra que se trabajó sin adición de agua el mayor porcentaje de actividad residual está dado por la temperatura de 45°C y corresponde al 4.5%.

La figura No.7 representa una incubación de 6 horas. Lo más relevante al observar esta gráfica es lo siguiente:

-La temperatura óptima para la enzima después de 6 horas de incubación resultó ser 45°C en los tres contenidos de agua, siendo mayor el porcentaje de actividad residual en la muestra que contiene 0.95ml de agua.

-A temperaturas mayores de 45°C es decir, 50, 55, y 60°C la muestra con 0.47ml de agua presenta porcentajes de actividad residual mayores que los otros dos contenidos de agua manejados.

-Otro aspecto importante es que la muestra con 0.47ml de agua presenta homogeneidad en sus porcentajes, es decir, a este contenido de agua la enzima presenta una buena estabilidad a la temperatura; esto se observa en los porcentajes de actividad residual con las temperaturas de 40, 45, 50 y 55°C. En este rango los porcentajes de actividad son parecidos, no se observan cambios drásticos en los porcentajes como ocurre con el contenido de agua de 0.95ml.

-En la muestra a la cual no se adicionó agua podemos ver que la desnaturalización de la enzima es mayor al 95% en todo el rango de temperaturas manejado.

-Las temperaturas de 60 y 65°C demuestran que la enzima sufre una desnaturalización por efecto de la temperatura la cual ocurre muy rápidamente incluso desde la primer hora de incubación de la misma.

## 6.2 Efecto del contenido de agua.

Para observar de una manera más clara el efecto del agua adicionada, se trabajó con tres contenidos de agua diferentes en el medio heptanólico los cuales son:

- a) 0.95ml de agua.
- b) 0.47ml de agua.
- c) 0.00ml de agua.

Se decidió trabajar con los contenidos de agua antes mencionados debido a que existe el interés por determinar que tanto influye el contenido de agua sobre la actividad enzimática en medios orgánicos.

Los resultados para analizar este efecto se pueden observar en las tablas 1, 2 y 3 de Porcentaje de actividad residual, las cuales muestran el efecto del contenido de agua sobre la actividad residual de la enzima, así como también, las figuras No 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 muestran la influencia de la cantidad de agua en todas las temperaturas de incubación manejadas a lo largo del desarrollo experimental del trabajo.

La tabla No.4 muestra los tiempos de vida media, y refleja también el efecto que tienen los diferentes contenidos de agua sobre la actividad residual de la enzima. Haciendo el análisis del efecto del contenido de agua considerando los tiempos de vida media de la enzima se observa lo siguiente.

a)0.95ml de agua:

A este contenido de agua que representa un 5.4% y es además la cantidad necesaria para obtener la saturación del 1-heptanol, se obtuvieron los tiempos de

vida media de las siguientes temperaturas de incubación 37, 40, 45, 50, y 55°C, el valor más alto fue el obtenido por la temperatura de 37°C y su valor fue 1.86 horas, esta temperatura representa la óptima para la enzima en condiciones normales, es decir, en medios acuosos, por lo que a temperaturas mayores es claro que hay una pérdida de la actividad catalítica, aspecto por el cual no resulta raro que el valor más alto este dado por 37°C.

El valor de tiempo de vida media a 45°C y con un contenido de agua de 0.95ml resulta ser el más alto de todos los demás, ya se había observado al hacer el análisis del efecto de la temperatura que la temperatura de 45°C representaba la mejor temperatura de incubación para la enzima en este medio y con este contenido de agua.

En general todos los tiempos de vida media obtenidos con este contenido de agua (0.95ml) representan una vida media por encima de 1 hora, lo que nos indica que la enzima a este contenido de agua presenta una buena estabilidad y que el efecto del mismo no resulta ser tan drástico en la desnaturalización, de hecho aún a la temperatura de 55°C con este contenido de agua la estabilidad es todavía alta.

b)0.47ml de agua.

En este contenido de agua que representa la mitad de la saturación del 1-heptanol, se obtuvieron los valores de tiempo de vida media en las siguientes temperaturas de incubación de la enzima: 37, 40, 45, 50 y 55°C.

Los valores para las temperaturas de 37 y 40°C resultan ser mayores que aquellos valores correspondientes a estas temperaturas para el contenido de agua de 0.95ml, esto nos hace pensar que a menor contenido de agua se aumenta la estabilidad de la enzima en estas temperaturas, esto ocurre cuando el efecto de la temperatura no es muy marcado ya que para las pruebas a 50 y 55°C el efecto de desnaturalización debido a la temperatura resulta ser ya demasiado alto y los tiempos de vida media por consecuencia resultan ser muy bajos.

c) 0.00ml de agua.

En este contenido de agua solo se pudieron obtener valores de tiempo de vida media en las siguientes temperaturas de incubación: 37, 40, y 45°C y que corresponden a 4.11, 0.27, y 0.13 horas respectivamente se observa que el tiempo de vida media para la temperatura de 37°C es muy alto comparado con los valores de 40 y 45°C.

El tiempo de vida media a 37°C que nos proporcionó el valor más alto de los tres contenidos de agua manejados en el experimento fue el obtenido por la muestra en la cual no se adicionó agua al 1-heptanol, esto nos indica que la cantidad de agua necesaria por la enzima para mantener la actividad catalítica es muy baja cuando se trabaja en lo que representa su temperatura óptima.

A 37°C el efecto del contenido de agua nos indica que a mayor contenido de agua, menor actividad catalítica de la enzima efecto que no se observa a temperaturas mayores.

### 6.3 Estabilidad térmica en medio orgánico y acuoso.

Debido a que estamos probando la estabilidad térmica de la  $\beta$ -galactosidasa en un medio de reacción no acuoso (1-heptanol) es necesario hacer una comparación entre el medio heptanólico y el medio acuoso que representa el medio tradicional de catálisis para la enzima.

La figura No1. muestra la estabilidad de ambos medios a la temperatura óptima de la enzima (37°C), donde se reporta el porcentaje de actividad residual de la enzima durante un periodo de 6 horas de incubación.

La muestra que contiene el medio heptanólico se trabajó sin adición de agua para que la comparación de ambos medios resultara más clara.

En la figura se observa que el medio heptanólico presenta una mayor estabilidad ya que al término de la primer hora de incubación la actividad residual del medio heptanólico es del 80.6% contra la actividad residual del medio acuoso que fue del 30.6%.

Para la segunda hora de incubación se tiene los siguientes porcentajes: 64.0 y 16.4 en los medios heptanólico y acuoso respectivamente.

En la tercer hora de incubación la enzima en el medio acuoso pierde casi completamente su actividad residual ya que ésta es del 2.7% solamente, comparándola con la actividad residual del medio heptanólico la cual es de 62.9% resulta muy clara la desnaturalización en el medio acuoso.

Otro punto de comparación entre estos dos medios de reacción se observa en la tabla No 4 en la cual se tiene que el tiempo de vida media para la enzima en el

medio heptánico sin agua adicional es de 4.11 horas y el medio acuoso presenta una vida media de 0.62 horas ambos resultados obtenidos a 37°C.

Esto nos da una clara diferencia entre ambos medios desde el punto de vista actividad residual y nos permite reconocer que el medio heptánico le confiere una mayor estabilidad a la enzima.

## CONCLUSIONES.

-Para este sistema ( $\beta$ -galactosidasa en 1-heptanol) la temperatura que en general mantuvo mayor estabilidad resultó ser 45°C.

-La desnaturalización de la enzima fue muy drástica del orden de 90% aproximadamente a partir de la temperatura de 60°C.

-La estabilidad térmica de la  $\beta$ -galactosidasa se ve más favorecida en el 1-heptanol en comparación con el medio acuoso.

-El contenido de agua de 0.47ml ofrece una buena estabilidad a la temperatura desde 40°C hasta 55°C presentando resultados homogéneos.

-El contenido de agua que representa la saturación del 1-heptanol y que corresponde a 0.95ml resultó favorecer la estabilidad de la enzima al tratamiento térmico a temperaturas por abajo de 50°C.

-La muestra en la cual no se adicionó agua resultó ser la menos estable de todas al incremento de temperatura.

-El incremento del contenido de agua disminuye la actividad residual de la enzima esto, a temperaturas por arriba de 50°C

-Para incubaciones por períodos arriba de 3 horas resulta más eficiente realizar la incubación de la enzima con un contenido de agua de 0.47ml en el medio heptanólico.

-De los resultados se puede inferir la hipótesis de que el contenido de agua de la fase orgánica que permite una mayor estabilidad térmica de la enzima es dependiente de la temperatura de incubación, lo cual hace suponer que un cierto grado de hidratación de esta proteína favorece su estabilidad a temperaturas por arriba de 37°C.

## RECOMENDACIONES.

-Resultaría conveniente inmovilizar la enzima ya que como se sabe las enzimas inmovilizadas presentan mayor estabilidad en comparación con las mismas en su forma libre.

-El usar enzimas que provengan de fuentes termofílicas resultaría en una mayor estabilidad térmica. El hongo *Aspergillus niger* podría ser una fuente adecuada para la obtención de  $\beta$ -galactosidasa.

-Para una mejor estabilidad de la enzima en las reacciones de síntesis y tener menos competencia con las reacciones de hidrólisis sería conveniente conocer la cantidad necesaria de agua ligada que pudiera retener la enzima y trabajar con este valor, particularmente conociendo la cantidad de agua que pudiera permitir la máxima estabilidad térmica.

-Los experimentos para obtener el contenido de agua necesario para mantener la actividad catalítica de la enzima se deben realizar sin la influencia de otras variables, es decir, a la temperatura óptima de la misma en este caso para la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* a 37°C.

-Es conveniente realizar un estudio de estabilidad térmica como el propuesto en este trabajo con varias enzimas provenientes de fuentes termofílicas con el fin de encontrar las temperaturas óptimas de éstas en el medio orgánico deseado y elegir la más conveniente para estudios posteriores sobre reacciones de alcoholisis de acuerdo a los objetivos deseados.

-Medir la actividad residual con otro parámetro además de la hidrólisis del ONPG con el objeto de tener más parámetros que nos proporcionen información sobre la actividad residual de la enzima.

## BIBLIOGRAFIA.

Ainsworth S. J. 1992. Cosmetics suppliers rally to meet consumer concerns. Chemical Engineering. News 70, 31-52.

Bárzana E. y López-Munguía A. 1993. La tecnología enzimática. En: Biotecnología Alimentaria. Ed por García Garibay M., Quintero R., López-Munguía A. Limusa S.A. México D.F.

Belitz H. D. y Werner G. 1988. Química de los alimentos Capítulo 2 pp 75-131 Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España.

Blinkovsky M. A., Martin D. B. y Dordick S. J. 1992. Enzymology in monophasic organic media. Current Opinion in Biotechnology. 3, 124-129.

Braverman J. B. S. 1990. Introducción a la Bioquímica de los alimentos Capítulo 3 pp 30-45 Editorial El Manial Moderno, S. A. de C. V. México D. F.

Cote G. L. y Tao B. Y. 1990. Oligosaccharide synthesis by enzymatic transglycosylation. Glycoconjugate Journal. 7, 145-162.

Dordick S.J. 1991. Non-aqueous enzymology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2, 401-407.

Drouet P., Zhang M., Legoy M.D. 1994. Enzymatic synthesis of alkyl- $\beta$ -D-Xylosides by transxylosylation and reverse hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 1075-1080.

Fennema O.R. 1985. *Introducción a la Ciencia de los Alimentos* Capítulo 6 pp 331 Editorial Reverté, S. A. España.

Gaceta P. y Hubble J. 1990. *Tecnología de las enzimas*. Capítulo 10 pp. 159-164. editorial Acribia. Zaragoza España.

Klibanov A.M. 1989. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends in Biochemical Science*. 14, 141-144.

Lehninger L.A. 1991. *Bioquímica (Las bases moleculares de la Estructura y función celular)* Capítulo 8 y 9 pps 189, 223. Editorial Omega, S. A. Barcelona 15ª edición.

Lu A., Dordick S.J., Gorman S. 1992. Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*. 39, 392-397.

McEvily A. J. y Zacks A. 1991. Emulsifiers and surfactants. En: Biotechnology and Food Ingredients. Ed. por Goldberg I. y Williams R. Van Nostrand Reinhold, New York pp. 193-221.

Nilsson K. G. I. 1991. Use of glycosidases and glycosyltransferases in the synthesis of complex oligosaccharides and their glycosides. En: Enzymes in Carbohydrate Synthesis. Ed. por Bednarski M.D. y Simon E.S. American Chemical Society, Washington D.C. pp. 51-62.

Panintrarux C., Adachi S., Araki Y. 1995. Equilibrium yield of n-alkyl- $\beta$ -D-glucoside through condensation of glucose and n-alcohol by  $\beta$ -glucosidase in a biphasic system. *Enzyme and Microbial technology*. 17, 32-40.

Pine S. H., Hendrickson J. B., Cram D. J., Hammond G. S. 1988. *Química Organica*. Editorial McGraw Hill, S. A. 4ª edición. México D.F.

Santin M., Rosso F., Sada A. y Peluso G. 1996. Enzymatic synthesis of 2- $\beta$ -D-galactopyranosyloxy Ethyl Methacrylate (GalEMA) by the thermophilic Archeon *Sulfolobus sulfataricus*. *Biotechnology and Bioengineering*. 49, 217-222.

Shinoyama H., Kamiyama Y., Yasui T. 1988. Enzymatic synthesis of alkyl- $\beta$ -Xylosides from Xylobiose by application of the transxylosyl reaction of *Aspergillus niger*  $\beta$ -Xylosidase. *Agriculture and Biological Chemistry*. 52, 2197-2202.

Shinoyama H., Takei K., Ando A., Fujii T., Sasaki M., Doi Y., Yasui T. 1991. Enzymatic synthesis of useful alkyl- $\beta$ -glucosides. *Agriculture and Biological Chemistry*. 55, 1679-1681.

Shinoyama H., Yasui T. 1988. Superiority of *Aspergillus niger*  $\beta$ -Xylosidase for the enzymatic synthesis of alkyl- $\beta$ -Xylosides in the presence of a variety of alcohols. *Agriculture Biological Chemistry*. 52, 2375-2377.

Stevenson D. E., Stanley R. A. y Furneaux H. R. 1993. Optimization of alkyl  $\beta$ -D-galactopyranoside synthesis from lactose using commercially available  $\beta$ -galactosidases. *Biotechnology and Bioengineering*. 42, 657-666.

Toone E. J., Simon E. S., Bednarski M. D. y Whitesides G. M. 1989. Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Tetrahedron*. 45, 5365-5422.

Trevañ M. D., Boffey S., Stanbury P. 1990. *Biocología principios biológicos*. Capítulo 15. pp 259-260. Editorial Acirbia, S. A. Zaragoza España.

Trincone A., Nicolaus B., Lama L., Morzillo P. 1991. Enzyme-catalyzed synthesis of alkyl  $\beta$ -D-Glycosides with crude homogenate of *Sulfolobus sulfataricus*. *Biotechnology Letters*. 13, 235-240.

Van Dyke M. I., Lee H., Trevors J. T. 1991 Applications of microbial surfactants. *Biotechnology Advances*. 9, 241-252.

Volkov B. D., Staubli A., Langer R., Klivanov A. M. 1991. Enzyme thermoinactivation in anhydrous organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*. 37, 843-853.

Vulfson N. E., Patel R., Law A. B. 1990. Alkyl- $\beta$ -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Biotechnology Letters*. 12, 397-402.

Vulfson N. E., Patel R., Becher J. E., Andrews T. A. y Law B. A. 1990. Glycosidases in organic solvents: Alkyl- $\beta$ -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Enzyme and Microbial Technology*. 12, 950-954.

Wallenfels K y Malhotra O. P. 1961. Galactosidases. *Advances in Carbohydrate Chemistry*. 16, 239-298.

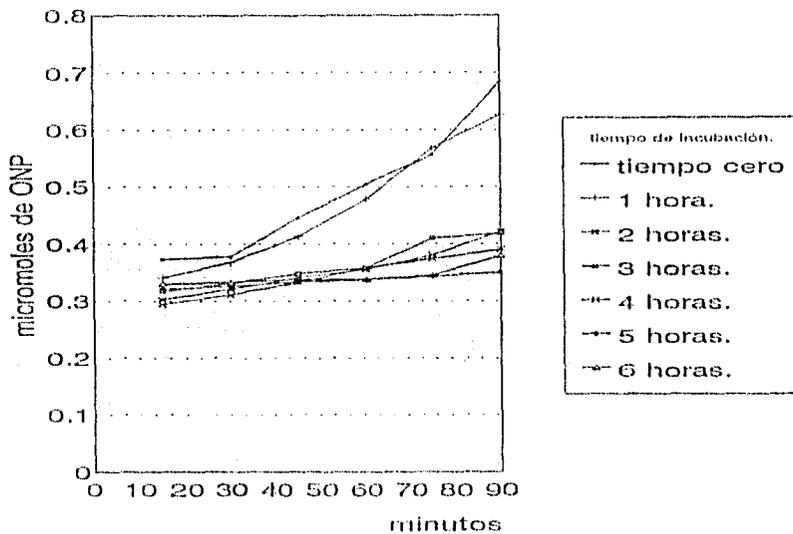
## APENDICE.

Este apéndice contiene todos los resultados obtenidos durante el desarrollo del trabajo experimental.

Se presentan las gráficas que ilustran la actividad residual de la enzima en los diferentes tiempos de incubación, en todas las temperaturas que se manejaron y con los tres diferentes contenidos de agua.

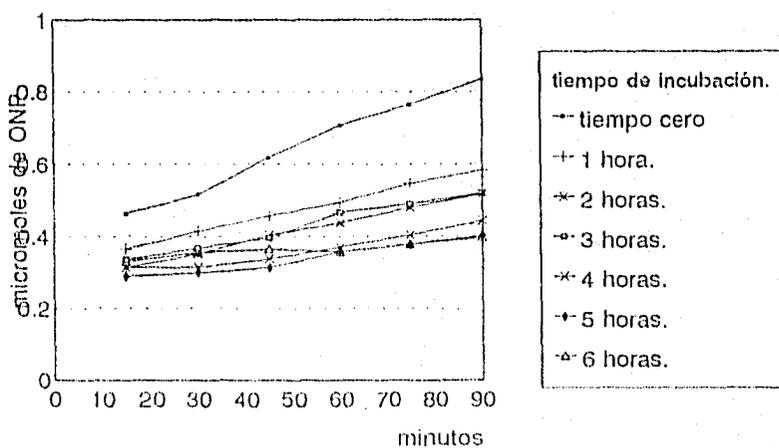
Este apéndice consta de 21 gráficas que llevan por nombre: "Cinética de producción de ONP".

## Cinética de producción de ONP.



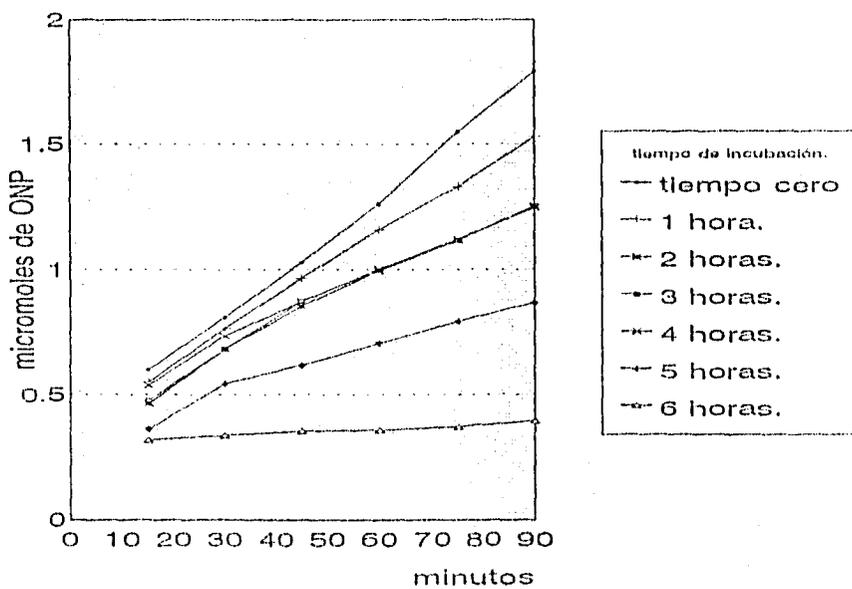
37°C  
 contenido de agua=5.4%

## Cinética de producción de ONP.



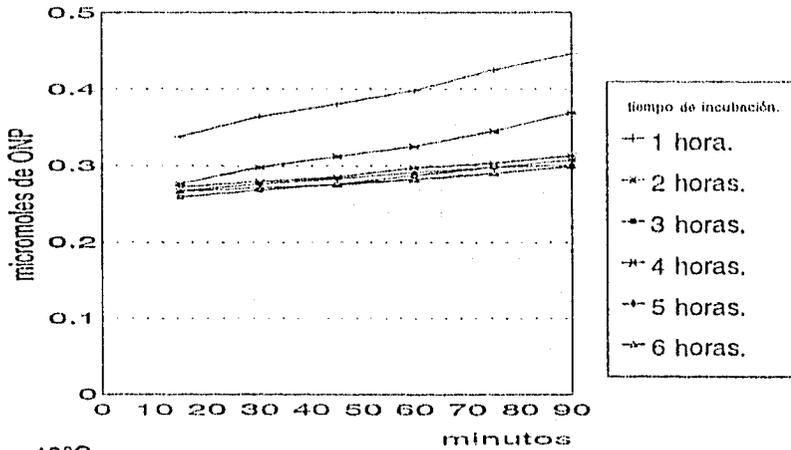
37°C  
 contenido de agua=2.7%

## Cinética de producción de ONP.



37°C  
contenido de agua=0.0%

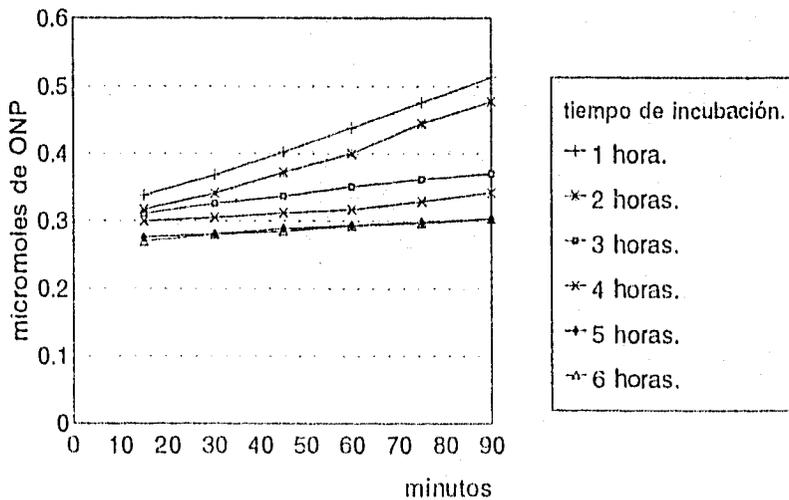
# Cinética de producción de ONP.



40°C

contenido de agua=5.4%

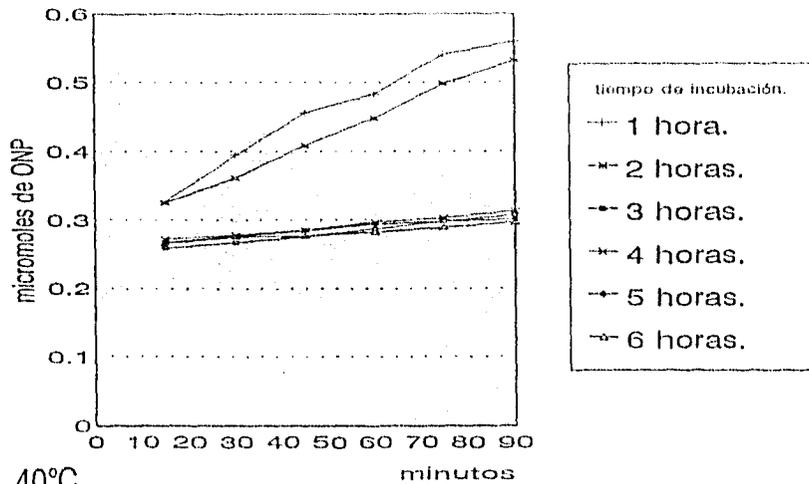
# Cinética de producción de ONP.



40°C

contenido de agua=2.7%

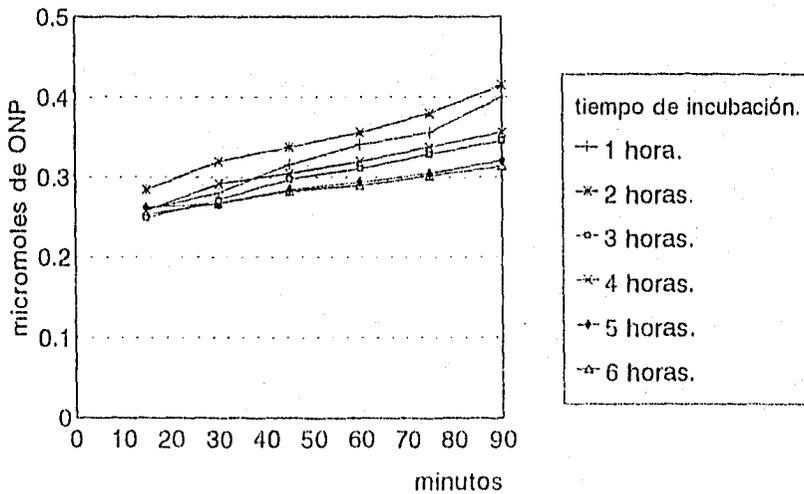
## Cinética de producción de ONP



40°C

contenido de agua=0.0%

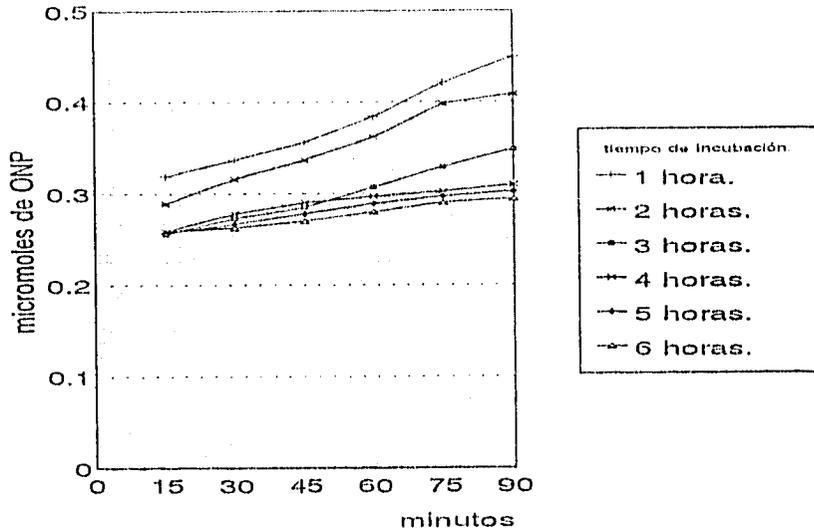
## Cinética de producción de ONP.



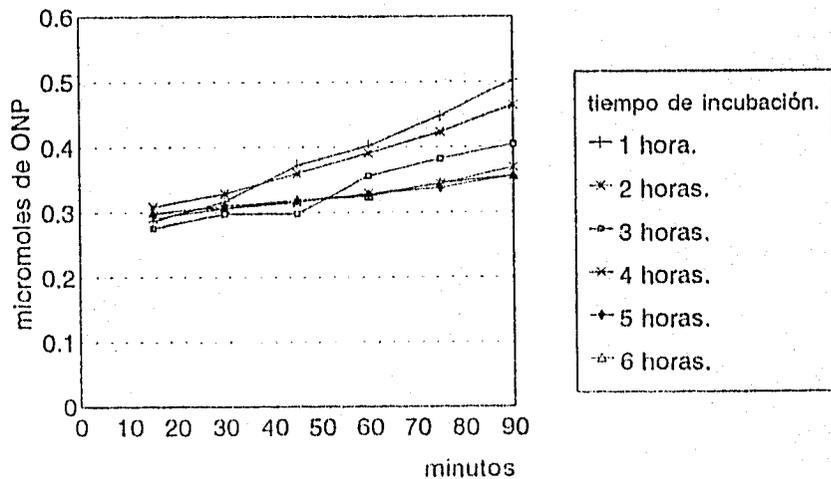
45°C

contenido de agua=5.4%

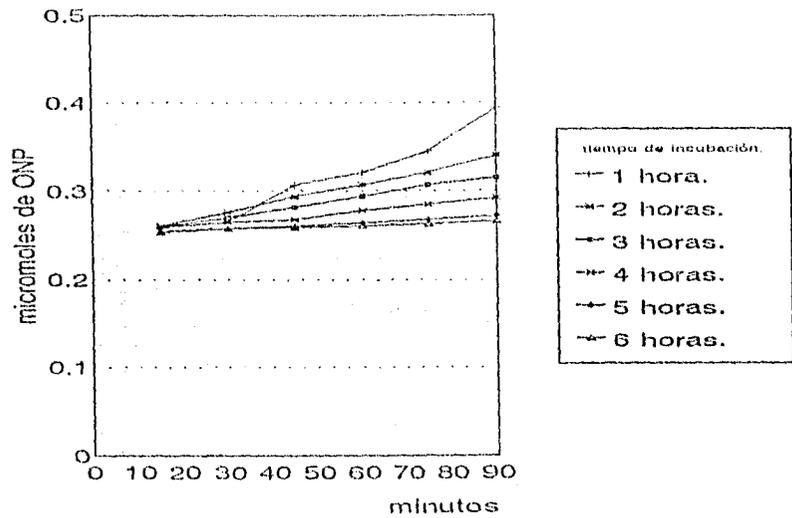
## Cinética de producción de ONP



## Cinética de producción de ONP.

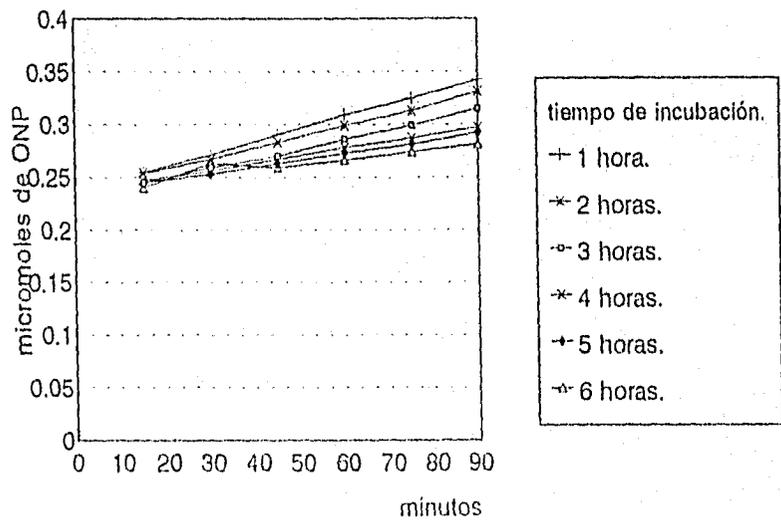


## Cinética de producción de ONP.



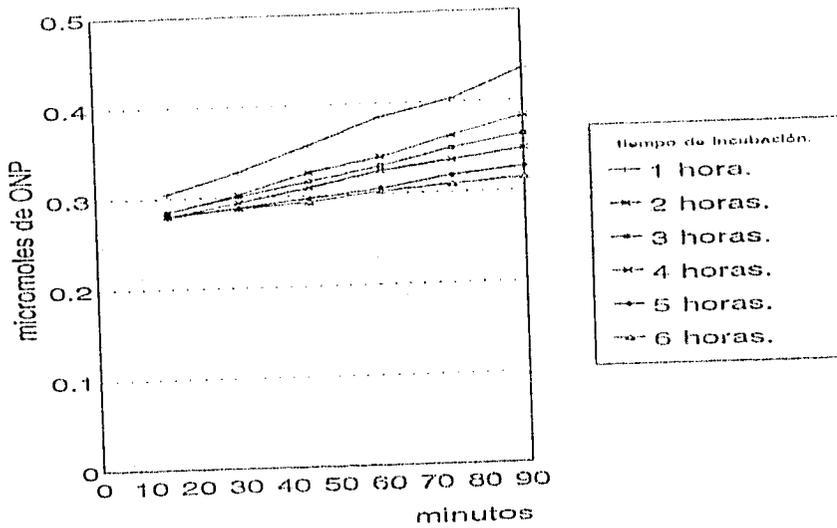
50°C  
contenido de agua=5.4%

## Cinética de producción de ONP.



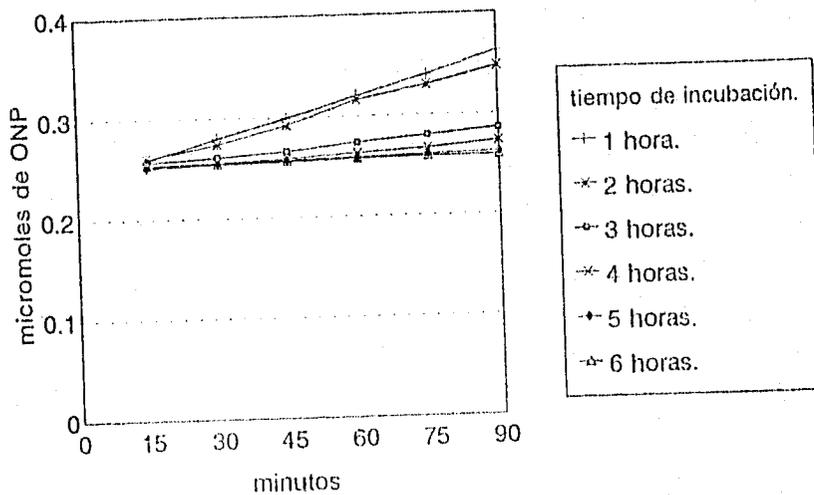
50°C  
contenido de agua=2.7%

## Cinética de producción de ONP.



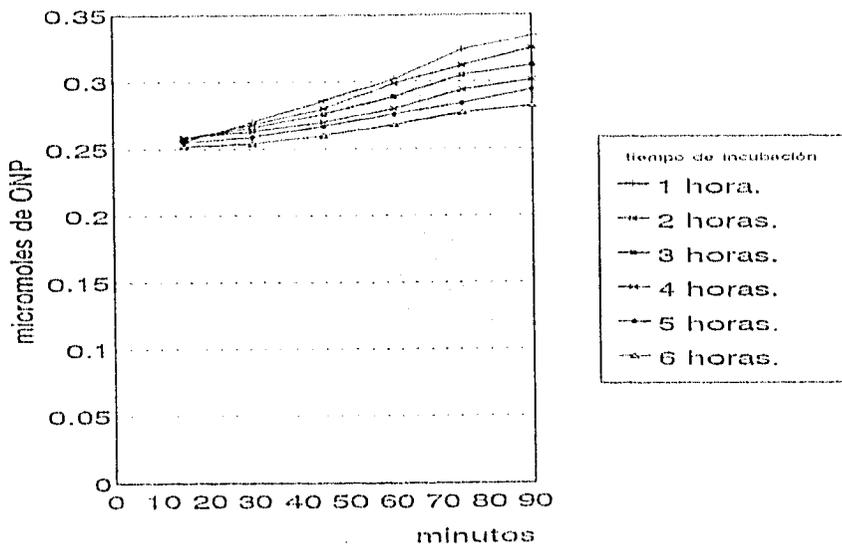
50°C  
contenido de agua=0.0%

## Cinética de producción de ONP.



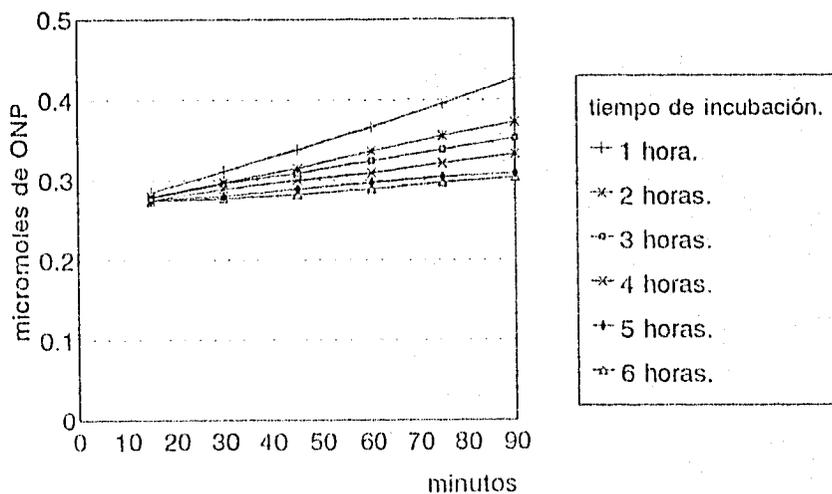
55°C  
contenido de agua=5.4%

## Cinética de la producción de ONP.



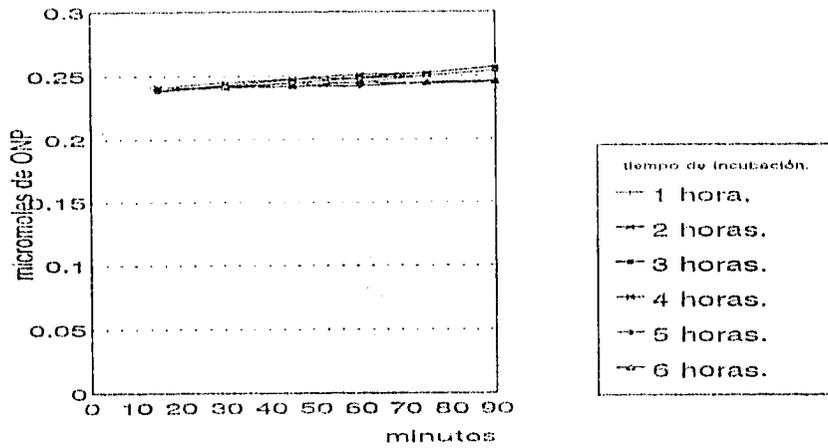
55°C  
contenido de agua=2.7%

## Cinética de producción de ONP.



55°C  
contenido de agua=0.0%

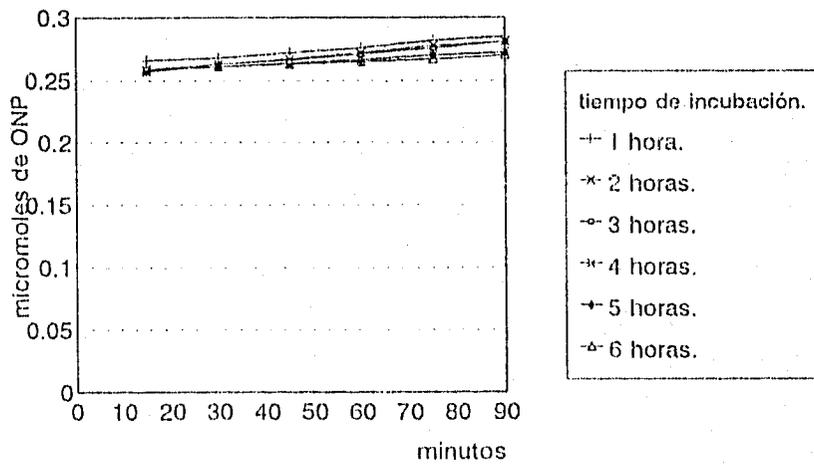
## Cinética de producción de ONP.



60°C

contenido de agua=5.4%

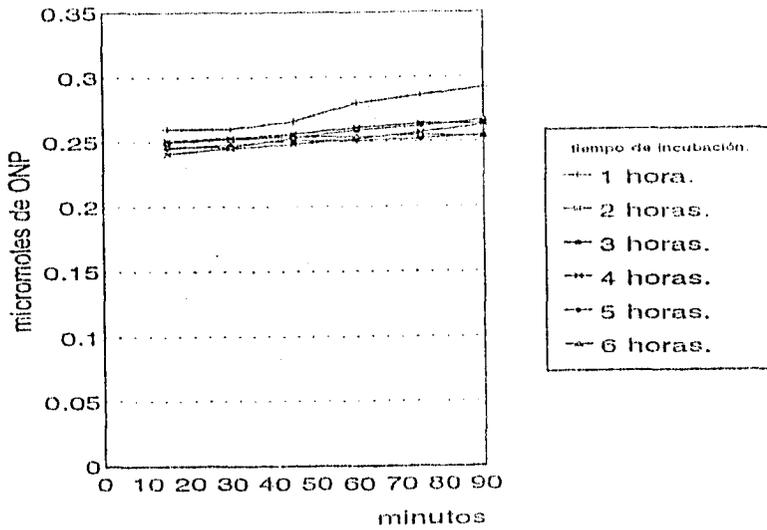
## Cinética de producción de ONP.



60°C

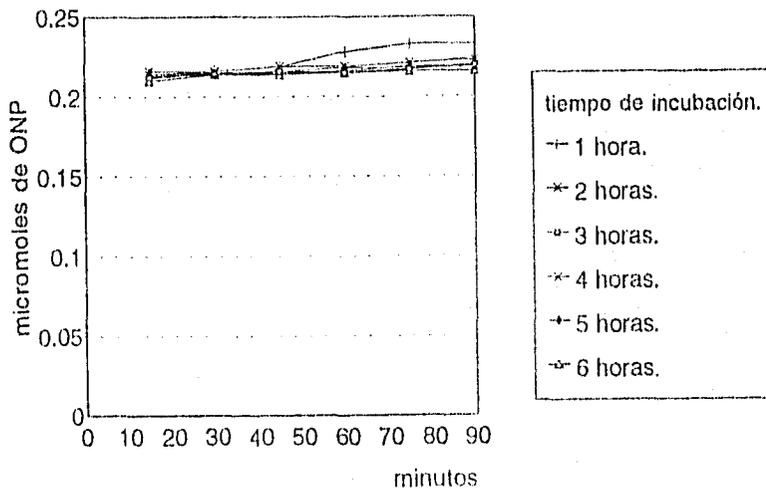
contenido de agua=2.7%

## Cinética de producción de ONP.



60°C  
contenido de agua=0.0%

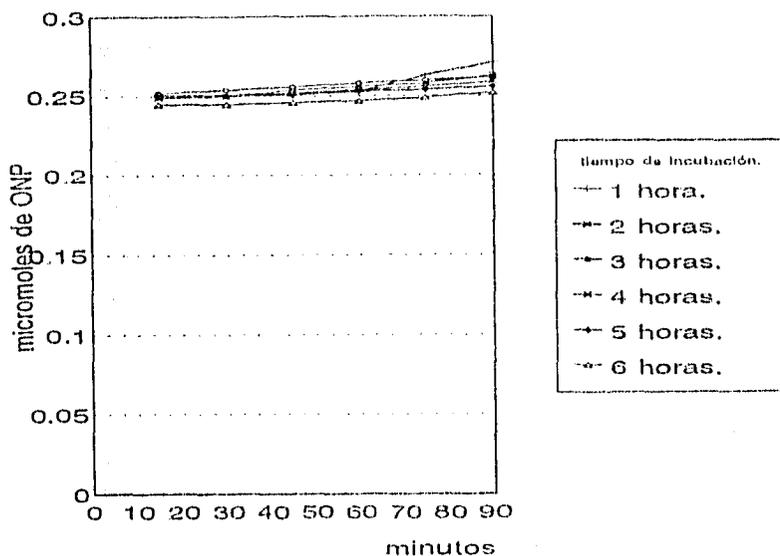
## Cinética de producción de ONP.



65°C  
contenido de agua=5.4%

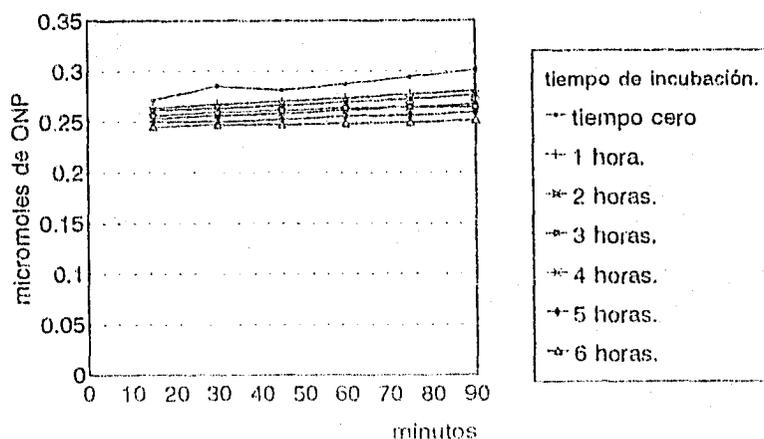
ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## Cinética de la producción de ONP.



65°C  
contenido de agua=2.7%

## Cinética de producción de ONP.



65°C  
contenido de agua=0.0%