



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efecto de la alta presión hidrostática sobre enzimas hidrolasas:
endoinulinasa y endoproteasa**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Laura Jeanine Tafoya Olivos



Ciudad de México

2021



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 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:

PRESIDENTE: **Profesor:** **López Munguía Canales Agustín**

VOCAL: **Profesor:** **Tecante Coronel Alberto**

SECRETARIO: **Profesor:** **Farrés González Sarabia Amelia María de Guadalupe**

1er. SUPLENTE: **Profesor:** **García Arrazola Roeb**

2° SUPLENTE: **Profesor:** **Ramírez Gilly Mariana**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA. LABORATORIO 313. CONJUNTO E,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Alberto Tecante Coronel

SUPERVISOR TÉCNICO:

I A. Mariana Ramírez Gilly

SUSTENTANTE:

Laura Jeanine Tafoya Olivos

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Carmina Montiel Pacheco y al Dr. Miguel Gimeno Seco por haberme proporcionado las enzimas para la elaboración de este trabajo.

Asimismo, agradezco a la Dra. Carmina Montiel Pacheco y al profesor Jonathan Trapala Reyna por la asesoría en la purificación de la endoinulinasa y por haberme permitido usar las instalaciones del L-314.

Agradezco a la I. A. Mariana Ramírez Gilly, por el apoyo técnico para la realización de las pruebas de alta presión.

Agradezco al Dr. Agustín López Munguía y la Dra. Amelia Farrés González Sarabia por la asesoría y el apoyo para poder concluir satisfactoriamente el trabajo de investigación escrito.

Finalmente, agradezco al Dr. Alberto Tecante Coronel, por la oportunidad, el apoyo y la asesoría brindada durante la realización de este trabajo.

Índice

Agradecimientos.....	3
Lista de abreviaturas	6
Resumen.....	11
Abstract.....	12
CAPITULO I	13
ANTECEDENTES	13
Enzimas	13
<i>Enzimas en los alimentos</i>	14
<i>Inulinasas</i>	14
<i>Proteasas</i>	16
Procesamiento por alta presión hidrostática (APH)	18
<i>Fundamento de la APH</i>	21
<i>Efecto de la APH sobre la conformación de enzimas</i>	22
<i>Mecanismo de inactivación de enzimas por APH</i>	23
Calorimetría de barrido diferencial.....	24
<i>Fundamento de la DSC</i>	26
CAPITULO II	27
JUSTIFICACIÓN	27
Hipótesis	28
Objetivo principal.....	28
Objetivos particulares.....	28
CAPITULO III	29
METODOLOGÍA.....	29
1. Obtención de las enzimas endoinulina y endoproteasa.....	30
2. Purificación de la Inulina	30
3. Determinación de la cantidad de proteína soluble de inulina	31
4. Determinación de la actividad enzimática	31
4.1 <i>Endoinulina</i>	31

4.2 Endoproteasa.....	32
4.2.2 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de la endoproteasa.....	32
5. Preparación de muestras	32
6. Análisis térmico	32
7. Tratamiento de las enzimas por alta presión hidrostática.....	33
8. Análisis estadístico	33
CAPITULO IV.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
1. Purificación de inulinasa por exclusión molecular	34
1.1. Seguimiento de la purificación por electroforesis SDS-PAGE	34
2. Cuantificación de proteína soluble.....	36
3. Análisis de la actividad enzimática	37
3.1. Curvas de calibración	37
3.2. Efecto de la temperatura y el pH, sobre la actividad enzimática de las hidrolasas ...	38
4. APH y análisis térmico	43
CAPITULO V.....	52
CONCLUSIONES.....	52
Perspectivas.....	53
ANEXO A.....	59
ANEXO B.....	61
ANEXO C.....	63

Lista de abreviaturas

ANOVA	Análisis de varianza
APH	Alta presión hidrostática
BSA	Albúmina de suero bovino
μ DSC	Microcalorimetría de barrido diferencial
DNS	Ácido 3,5 dinitro-salicílico
EE. UU	Estados Unidos
FOS	Fructooligosacáridos
PI	Potencial isoeléctrico
SC	Subtilisina Carlsberg
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TCA	Ácido tricloroacético
TLC	Cromatografía en capa fina
UI	Unidad de actividad enzimática

Nomenclatura

a	Actividad enzimática adimensional
C_p^{buffer}	Capacidad calorífica del buffer
C_p^{exceso}	Capacidad calorífica de exceso
$C_p^{\text{proteína}}$	Capacidad calorífica de la disolución de proteína
E_d	Energía de inactivación de la enzima
K	Constante de equilibrio
k_{irr}	Constante de velocidad irreversible
Q	Flujo de calor
R	Constante de los gases (0.0083144 kJ/mol·K)
T	Temperatura absoluta
T_m	Temperatura a la que la capacidad calorífica es máxima
T_{opt}	Temperatura óptima de actividad enzimática
ΔC_p	Diferencia de capacidad calorífica
ΔH	Diferencia de entalpía

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de ruptura de endo y exo inulinasas.	15
Figura 2. Estructura química de la inulina con moléculas terminales de glucosa (A) y fructosa (B).....	16
Figura 3. Aumento de la vida útil de algunos productos alimenticios tratados por APH.	20
Figura 4. Modelo propuesto para los efectos de la alta presión sobre la conformación de la estructura enzimática	24
Figura 5. Representación esquemática del cambio en la capacidad calorífica en exceso con la temperatura para la desnaturalización térmica de una proteína disuelta en buffer.	25
Figura 6. Cromatograma de la purificación de inulina por exclusión molecular. ..	34
Figura 7. Electroforesis de pico 1 (Fracciones 10 y 11). M: Marcador de masa molar, A: 40 μ L de fracción 10, B: 40 μ L de fracción 11.....	35
Figura 8. Electroforesis de las fracciones 14 y 15, pico 2, a diferentes volúmenes. M: Marcador de masa molar, A: 20 μ L de fracción 14, B: 30 μ L de fracción 14, C: 40 μ L de fracción 14, D: 20 μ L fracción 15, E: 30 μ L fracción 15, F: 40 μ L fracción 15.....	35
Figura 9. I: Control de Inulina 0.5 %, F: Control de Fructosa 0.5%, R1: Reacción de fracción 10 y 11 con Inulina, R2: Reacción de fracción 14 y 15 con inulina.	36
Figura 10. Reacción de oxidación de azúcares reductores, método DNS.	37
Figura 11. Reacción entre la caseína y el reactivo de Folin.....	38
Figura 12. A: Actividad enzimática en disoluciones de inulina de 0.5 g en 100 mL de buffer de acetatos 0.05 M en función de la temperatura. B: Predicción de la actividad enzimática adimensional con la temperatura.	40
Figura 13. Arriba: Actividad enzimática en caseína 0.65 mg/mL en buffer de fosfato de potasio 50 mM, y la endoproteasa disuelta en buffer de acetato de sodio 10 mM con acetato de calcio 5 mM, pH 7.5 en función de la temperatura. Abajo: Predicción de la actividad enzimática adimensional con la temperatura.	41
Figura 14. Actividad enzimática en disoluciones de inulina de Achicoria 0.5 g en 100 mL incubadas a 50 °C en función del pH en un intervalo de 3.49 a 9.01.	42

Figura 15. Actividad enzimática en caseína 0.65 mg/mL de buffer de fosfato de potasio 50 mM, incubadas a 37 °C en función de pH en un intervalo de 3.5 a 10.5.	43
Figura 16. Actividad enzimática de la endoinulinasa en disoluciones de inulina de 0.5 g/100 mL de buffer de acetatos 0.05 M, pH 5 a 50 °C, después de los tratamientos de APH (400 MPa y 600 MPa por 5 min).....	44
Figura 17. Variación con la temperatura de la capacidad calorífica de la endoinulinasa sin tratamiento por APH para una concentración de 8 g/100 mL en buffer de acetatos pH 5, a una tasa de 0.8 °C/ min. Línea punteada: transición predicha por la ecuación C6 (Anexo C).	45
Figura 18. Variación con la temperatura de la capacidad calorífica de la endoinulinasa tratada a 400 MPa para una concentración de 8 g/100 mL en buffer de acetatos pH 5, a una tasa de 0.8 °C/ min. Línea punteada: transición predicha por la ecuación C6 (Anexo C).	45
Figura 19. Variación con la temperatura de la capacidad calorífica de la endoinulinasa tratada a 600 MPa para una concentración de 8 g/100 mL en buffer de acetatos pH 5, a una tasa de 0.8 °C/ min. Línea punteada: transición predicha por la ecuación C6 (Anexo C).	46
Figura 20. Actividad enzimática de la endoproteasa en disoluciones de caseína 0.65 mg/mL en buffer fosfatos, pH 7.5, incubadas a 37 °C, después de los tratamientos de APH (400 MPa y 600 MPa por 5 min).....	48
Figura 21. Variación con la temperatura de la capacidad calorífica de la endoproteasa sin tratamiento por APH para una concentración de 5 g/100 mL en buffer de fosfatos, pH 7.5, a una tasa de 1.2 °C/min. Línea punteada: transición predicha por la ecuación C6 (Anexo C).	49
Figura 22. Variación con la temperatura de la capacidad calorífica de la endoproteasa tratada a 400 MPa para una concentración de 5 g/100 mL en buffer de fosfatos, pH 7.5, a una tasa de 1.2 °C/min. Línea punteada: transición predicha por la ecuación C6 (Anexo C).	50
Figura 23. Variación con la temperatura de la capacidad calorífica de la endoproteasa tratada a 600 MPa para una concentración de 5 g/100 mL en buffer de fosfatos,	

pH 7.5, a una tasa de 1.2 °C/min. Línea punteada: transición predicha por la ecuación C6 (Anexo C).....50

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación internacional de las enzimas.	13
Cuadro 2. Aplicaciones de APH en algunos productos alimentarios..	20
Cuadro 3. Ventajas y desventajas de método de conservación por alta presión hidrostática.	22
Cuadro 4. Reactivos y equipo	29
Cuadro 5. Tabla de purificación de endoinulinasa	36
Cuadro 6. Propiedades termodinámicas de la endoinulinasa tratada por APH y la endoinulinasa sin tratamiento (control), obtenidas a partir de los termogramas de DSC (Anexo C).	47
Cuadro 7. Propiedades termodinámicas de la endoproteasa tratada por APH y la endoproteasa sin tratamiento (control), obtenidas a partir de los termogramas de DSC (Anexo C).	51

Resumen

La alta presión hidrostática (APH) es una operación de conservación no térmica que ha tomado gran importancia en los últimos años en la industria de alimentos debido a su efectividad y a una menor pérdida de nutrientes y propiedades sensoriales comparada con los procesos térmicos que causan inevitablemente pérdida de nutrientes y sabores.

En la conservación de alimentos las enzimas tienen un papel importante durante el proceso y almacenamiento. Se ha observado un efecto de bioconservación de algunas bacterias lácticas como *Pediococcus* y *Enterococcus*, aisladas de productos cárnicos y quesos que producen hidrolasas, que se encargan de eliminar patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

En este trabajo, una endoinulinasa y una endoproteasa se usaron como modelos con el objetivo de evaluar la estabilidad de hidrolasas, que pueden estar presentes en algunos alimentos o son agregadas como ingredientes, ante el tratamiento por APH. Para ello se llevó a cabo su caracterización fisicoquímica, se determinó su actividad enzimática, y se examinó su estabilidad térmica mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en inglés). Se plantea que las enzimas retienen su estructura tridimensional dado que muestran actividad enzimática antes y después del tratamiento con APH.

Los tratamientos comerciales de APH en la industria de alimentos utilizan presiones superiores a 400 MPa para inactivar microorganismos patógenos. Por ello, se aplicaron presiones de 400 y 600 MPa con una exposición máxima de 5 min. Posteriormente, se examinaron por DSC para identificar la presencia de transiciones térmicas que pudiesen ser atribuidas a cambios en la estructura de las enzimas. Además, se determinó su actividad enzimática después de cada tratamiento y se comparó con enzimas no tratadas con APH.

La APH provocó cambios significativos en las enzimas. Sin embargo, se conservó 80 % o más de la actividad enzimática a 400 MPa y 70 % o más a 600 MPa, lo que indica que las enzimas se mantuvieron estables después del tratamiento por APH. Si las enzimas fueran parte de un alimento sometido a APH, el alimento mantendría sus características. No obstante, sería conveniente estudiar el efecto de la interacción entre la enzima y la matriz del alimento.

Abstract

High hydrostatic pressure (HHP) is a non-thermal preservation process that has taken on great importance in recent years in the food industry due to its effectiveness and reduced loss of nutrients and sensory properties regarding thermal processes that inevitably cause loss of nutrients and flavors.

In food preservation, enzymes play an essential role during the processing and storage of foods. A biopreservation effect has been found in some lactic bacteria such as *Pediococcus* and *Enterococcus*, isolated from meat products and cheese, which produce hydrolase enzymes and are responsible for eliminating pathogens like *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*.

In this work, an endoinulinase and an endoprotease were taken as models to evaluate the stability of this type of enzymes, that may be already present in some foods or added as ingredients, to HHP treatment as a preservation method. Their physicochemical characterization was carried out for this purpose, their enzymatic activity was determined, and their thermal stability was examined using differential scanning calorimetry (DSC).

It is proposed that the enzymes retain their three-dimensional structure as they show enzymatic activity before and after HHP treatment.

Commercial HHP treatments in the food industry use pressures higher than 400 MPa to inactivate pathogenic microorganisms. Therefore, 400 and 600 MPa were applied for maximum exposure of 5 min. Subsequently, enzymes were examined by DSC to identify the presence of thermal transitions that could be attributed to changes in their structure. Also, their enzymatic activity was determined after each treatment and compared with enzymes not treated with HHP.

The HHP caused significant changes in the enzymes. However, 80% or more of the enzymatic activity was preserved at 400 MPa and 70% or more at 600 MPa. This behavior indicates that the enzymes remained stable for HHP treatment. These results suggest that if the enzymes were part of a food subjected to HHP, the food would retain its characteristics; however, a study of the interaction between enzyme and food matrix is recommendable.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

Enzimas

Las enzimas son proteínas capaces de acelerar la velocidad de reacciones químicas. Tienen un poder catalítico superior al de los catalizadores sintéticos o inorgánicos, poseen un grado de especificidad elevado con respecto a sus sustratos y funcionan en disoluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH. Las enzimas son los catalizadores biológicos que están en el centro de todos los procesos bioquímicos. Son capaces de catalizar cientos de reacciones consecutivas en las que se degradan moléculas de nutrientes, se conserva y se transforma la energía química y se sintetizan macromoléculas biológicas a partir de precursores sencillos (Lehninger et al., 2006). Las enzimas se clasifican de acuerdo con las reacciones que catalizan (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación internacional de las enzimas (Lehninger et al., 2006, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2018).

CLASE	TIPO DE REACCIÓN CATALIZADA
Oxidorreductasas	Transferencia de electrones (óxido-reducción)
Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis; rompen o forman enlaces covalentes
Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
Isomerasas	Trasferencia de grupos dentro de moléculas generando formas isoméricas
Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N mediante reacciones de condensación acopladas a la ruptura de Adenosin Tri Fosfato (ATP)

Traslocasas	Catalizan el movimiento de iones o moléculas a través de las membranas.
--------------------	-------------------------------------------------------------------------

Enzimas en los alimentos

En la industria alimentaria, las enzimas juegan un papel importante en muchos procesos ya que pueden modificar la apariencia, la textura, el valor nutricional y generar aromas y sabores en los alimentos. Es por eso que alrededor del 40 % de las enzimas que se producen a nivel industrial son destinadas al sector de alimentos y bebidas (Rodríguez Alegría, 2013).

Las enzimas pueden estar relacionadas directamente con las reacciones metabólicas de las células que conforman un alimento, por ejemplo, la germinación de una semilla depende de que ésta se hidrate y de que enzimas hidrolicen el almidón para hacer disponible a la glucosa que la semilla necesita para desarrollarse. Por otro lado, que un fruto madure depende directamente de las enzimas presentes de acuerdo a la etapa de maduración, este es el caso de las pectinasas que son responsables del ablandamiento que sufren frutos al madurar como el jitomate, las manzanas, las peras, entre otras.

De igual forma, las enzimas también son utilizadas como ingrediente activo en la preparación de alimentos, como las proteasas de origen vegetal, tales como la papaína y bromelina utilizados como ablandadores de carne. Una aplicación que data desde las épocas más remotas del ser humano es el uso de las enzimas para la producción de queso, la renina o quimosina es una proteasa que hidroliza un solo enlace de la proteína más abundante de la leche, k- caseína, cuando se rompe el enlace se forma un coágulo conocido como cuajada, que se separa del suero, se sala y se prensa para obtener queso fresco.(Peña & Quirasco, 2014). En la actualidad, existe un problema común de intolerancia a la lactosa en la población, es por eso que comercialmente hay leche deslactosada que se obtiene al añadir la enzima β -galactosidasa a la leche, de esta manera se produce la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa.

Inulinasas

Las inulinasas son β -fructosidasas no específicas que hidrolizan inulina para producir fructosa y fructooligosacáridos (FOS) que pueden tener de tres hasta ocho unidades de

fructosa. Esta última y los FOS son compuestos importantes en la industria alimentaria y farmacéutica. Las inulinasas microbianas se clasifican de acuerdo con su vía de acción (Fig. 1). Las exoinulinasas (β -D-fructan-fructohidrolasa, EC 3.2.1.80) son aquellas que rompen el extremo no reductor de la inulina generando fructosa como producto principal. Las endoinulinasas (β -D-fructan-fructanohidrolasa, EC 3.2.1.7) hidrolizan los enlaces (2-1)- β -D-fructosídicos de la inulina generando FOS (Chen et al., 2009).

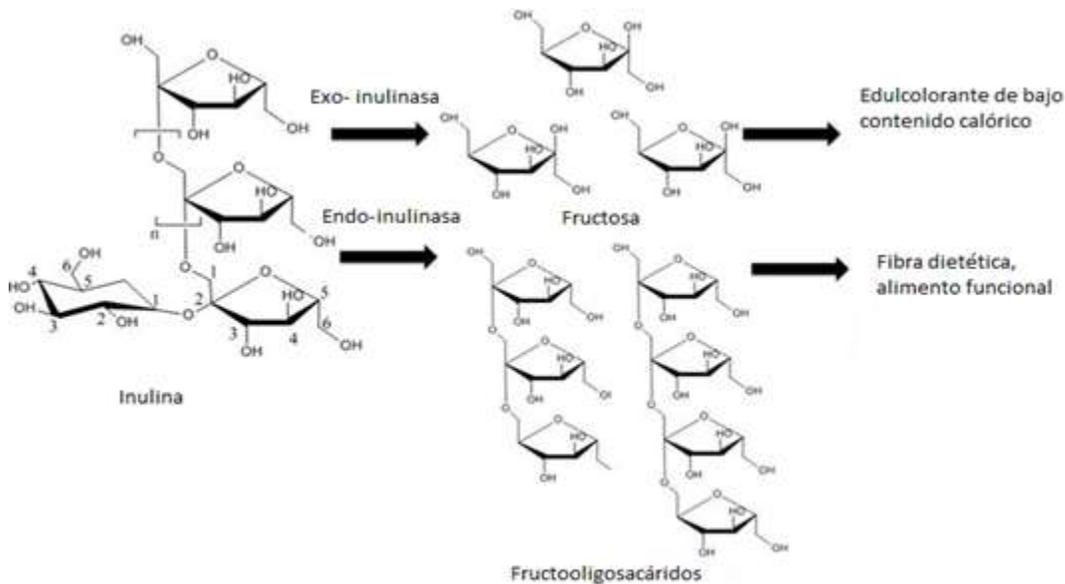


Figura 1. Mecanismo de ruptura de endo y exo inulinasas (Jiang et al., 2017).

La inulina es un fructano que se encuentra en más de 30,000 especies de plantas como carbohidrato de reserva, los fructanos son polímeros solubles de fructosa y glucosa, con enlaces β -(2-1) y β -(2-6) entre las moléculas de fructosa. (Arrizon et al., 2011), la fructosa puede unirse tanto a la glucosa como a la fructosa generando una gran variedad de fructanos que se clasifican principalmente en cinco clases estructurales: inulina, levana, mezclas de fructanos ramificados, neoserias de inulina y neoserias de levana. (Curbelo et al., 2012)

La inulina aparece de forma natural en plantas como la dalia (*Dahlia* spp.), la achicoria (*Cichorium intybus*), y la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*), entre otras.

Ha cobrado gran interés en la industria alimentaria debido a que se utiliza ampliamente como ingrediente ya que tiene propiedades de edulcorante de bajo aporte calórico (1,5

Kcal / g), actúa como prebiótico, modificador de textura y remplazo de grasa. (Castellanos et al., 2016; Corona González et al., 2005; Madrigal & Sangronis, 2007;). (Fig. 2)

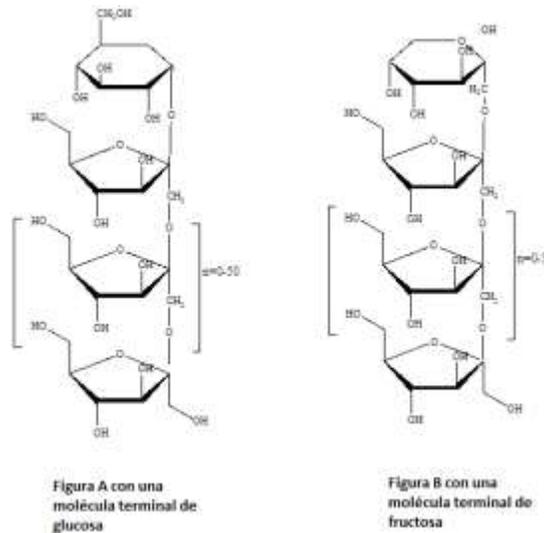


Figura 2. Estructura química de la inulina con moléculas terminales de glucosa (A) y fructosa (B).

Proteasas

Según la Nomenclatura del *Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)* las proteasas pertenecen a las enzimas hidrolasas (Webb, 1989), Estas enzimas son capaces de hidrolizar los enlaces peptídicos de otras proteínas en péptidos o aminoácidos libres. Se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas, microorganismos y hongos, donde participan en diversos procesos fisiológicos, como la digestión de las proteínas de los alimentos, la regulación de la presión arterial, la síntesis y degradación de proteínas virales, la apoptosis, entre muchas otras.

La NC- IUBMB divide a las peptidasas con base en su sitio de acción en exopeptidasas (EC 3.4.11-19) y endopeptidasas (EC 3.4.22-99). Las exopeptidasas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en los extremos libres de la cadena polipeptídica, las aminopeptidasas actúan en el extremo N-terminal libre de la cadena, liberando un único aminoácido, un dipéptido o un tripéptido, por otro lado, están las carboxipeptidasas que

hidrolizan el extremo C-terminal libre de la cadena y liberan un solo residuo de aminoácido o un dipéptido.

Las endopeptidasas son caracterizadas por llevar a cabo la hidrólisis de los enlaces peptídicos en el interior de la proteína y a su vez son clasificadas de acuerdo al tipo de aminoácidos que constituyen su sitio activo, así como la presencia de metales, por lo que se han subclasificado en serín- proteasas, aspartil- proteasas, cisteín- proteasas, y metalo- proteasas. (Dhillon et al., 2016; Viguera-Morales, 2019)

Con base a sus mecanismos catalíticos se propuso una clasificación que constituye siete subgrupos en la clasificación internacional, (Dhillon et al., 2016; Hartley, 1960):

- Serín proteasas. Se caracterizan por la presencia de un residuo de serina en su sitio activo. Son activas a pH neutro o alcalino con un pH óptimo entre 7 y 11 (Juan Ovejero, 2015). Su masa molar varía entre 18 y 126 kDa. Su punto isoeléctrico (PI) suele estar entre 4 y 6.
- Cisteín/tiol proteasas. Son un grupo muy variado de proteasas. Su actividad depende de una díada de cisteína e histidina. El pH óptimo es neutro, aunque algunas tienen su intervalo máximo de actividad enzimática en condiciones ácidas.
- Proteasas aspárticas. Presentan un residuo de ácido aspártico en su centro activo. Suelen conocerse como proteasas ácidas. El pH óptimo es entre 3 y 4 y su PI está en el intervalo de 3 a 4.5. Su masa molar varía entre 30 y 45 kDa.
- Proteasas glutámicas. Las proteasas glutámicas son similares a las aspárticas de origen fúngico. Tiene una díada catalítica única que consta de glutamina y glutamato. (Fujinaga et al., 2004; Laskar & Chatterjee, 2009)
- Metaloproteasas. Este grupo es el más variado de las proteasas, se caracterizan por su dependencia de un ion metálico divalente.
- Proteasas treonínicas. Este grupo es muy similar a las serín proteasas, la actividad enzimática suele ser máxima para pH alcalino.
- De mecanismo catalítico desconocido. Existe un número de peptidasas para las cuales el mecanismo catalítico no se ha deducido, y la secuencia de aminoácidos se ha denominado con la letra "U" (unclassified) y se les asigna un número arbitrario

En la industria alimentaria la principal aplicación de las proteasas es en la coagulación de las proteínas lácteas para la elaboración de quesos, el ablandamiento de carnes, en la industria panadera para degradar el gluten y mejorar la textura de la masa o para la elaboración de hidrolizados proteínicos de alto valor nutricional (Neklyudov et al., 2000).

Subtilisina Calsberg (SC)

La Subtilisina Calsberg (SC) fue descubierta por Lindestrom, Lang y Ottesen en los laboratorios Carlsberg en 1947 (Rao et al., 1998), es producida por la bacteria *Bacillus licheniformis*, y pertenece al grupo de las serín proteasas. Esta enzima pertenece a la subfamilia S8A de las subtilisinas y tiene una triada catalítica con un orden de secuencia Asp, His y Ser (Rawlings et al., 2006). Actúa como endoproteasa extracelular tiene un pH óptimo de 7.0-8.5, una masa molar de 27.5 kDa, la temperatura óptima es 60 °C.

Procesamiento por alta presión hidrostática (APH)

La APH es un proceso de conservación no térmico que somete productos a presiones entre 100 y 1000 MPa, generalmente se utiliza agua debido a su baja compresibilidad, al aumentar la presión se produce un descenso de volumen del agua, 4% a 100 MPa, 7% a 200 MPa, 11.55% a 400 MPa, con una temperatura de 22°C. (Bolufer, 2012; Domínguez-Ramírez, 2015; Pradas Baena & Moreno Rojas, 2016). Es una tecnología verde por el uso de agua como líquido compresor y energéticamente es muy eficiente. Su uso en plantas industriales se lleva a cabo por lotes. Consiste en una cámara de presión y un dispositivo generador de presión, los alimentos son sellados en su envase y colocados en la cámara, el agua se bombea hacia el interior de la cámara y una vez alcanzada la presión deseada el bombeo se detiene y se cierran las válvulas, por lo que la presión se puede mantener sin necesidad de aporte de energía. El trabajo de compresión aumenta la temperatura de los alimentos mediante un calentamiento adiabático y la extensión del aumento de temperatura varía de acuerdo con la composición del alimento de entre 3 a 9 °C/100 MPa. Al final del tiempo requerido de presurización (Cuadro 2) se descomprime la cámara para sacar el lote tratado y se inicia un nuevo ciclo (Elamin et al., 2015).

Esta tecnología adquirió importancia en las últimas dos décadas, pero se originó con las investigaciones del equipo de Bert H. Hite, iniciadas en 1897 sobre los efectos de

presiones de hasta 1000 MPa en la conservación de leche y frutas (Capellas Puig, 1998). Hite diseñó y construyó una unidad de alta presión para pasteurizar leche y otros alimentos y reportó que después de procesar leche a 667 MPa por 10 minutos había una reducción en la población microbiana de 10^7 células/mL a 10^1 - 10^2 células/mL, también hizo pruebas en carne aplicando una presión de 530 MPa por 60 minutos a 52°C y la carne no presentó carga microbiana durante tres semanas de almacenamiento. (Téllez-Luis et al., 2001).

En 1914, el equipo de Hite reportó que la presión podía ser usada para extender la vida de anaquel de frutas debido a que las levaduras y otros microorganismos que las afectan son susceptibles a la presión. En el mismo año, Bridgeman estudió el efecto de la alta presión sobre la clara de huevo y observó su coagulación, demostrando una desnaturalización irreversible de las proteínas de la clara a partir de 300 MPa. Sin embargo, fue hasta la década de los ochenta cuando se comenzaron a realizar estudios sobre los efectos de las altas presiones sobre los componentes de los alimentos, su incidencia sobre microorganismos y enzimas y modificaciones que se producen a nivel nutricional y sensorial. En 1990 la Universidad de Kyoto lanzó al mercado las primeras mermeladas de frutas tratadas por alta presión hidrostática, siendo Japón el país pionero en la producción y comercialización de alimentos presurizados (Téllez-Luis et al., 2001).

La implementación de la tecnología de APH ha tenido un gran éxito en el siglo XXI, debido a la alta demanda de los consumidores por tener productos frescos, menos procesados, sin conservadores químicos, seguros y que tengan una vida útil extendida.

En comparación con los tratamientos térmicos convencionales, la aplicación de la APH incrementa la vida de anaquel 4, 10 o hasta 30 veces más en condiciones de refrigeración en productos como bebidas, jugos, carnes y aderezos de verduras (Fig. 3).

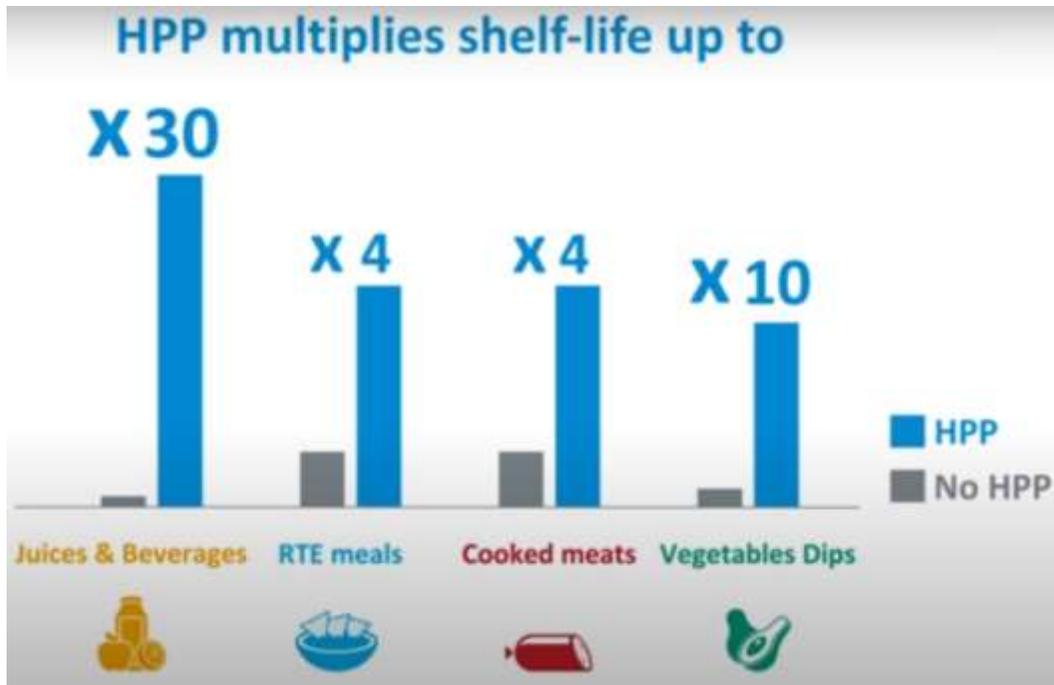


Figura 3. Aumento de la vida útil de algunos productos alimenticios tratados por APH. (HIPERBARIC, S.A., 2020)

Cuadro 2. Aplicaciones de APH en algunos productos alimentarios. Modificada de (Téllez-Luis et al., 2001).

Producto alimentario	Condiciones de tratamiento	Función de la Alta Presión	Referencia
Maíz	500 MPa, 5 min	Destrucción de la estructura cristalina del almidón	Hibi et al., 1993
Sorgo	500 MPa, 5 min	Mejora en la calidad de la malta de sorgo	Dewar et al., 1994
Zanahoria	400 MPa, -20°C	Mejora en la textura y estructura histológica	Fuchigami et al., 1997
Carne cruda de vaca	100-150 MPa 30 a 40 min, 20°C	Acelera la maduración, mejora la vida útil y provoca ablandamiento	Cheftel, 1995

Pastel de arroz	400 MPa, 10 min, 45 a 70 °C	Reducción de carga microbiana de la materia prima	Cheftel, 1995
Salchichas y pasteles de pescado	400 MPa	Gelatinización, disminución de la carga bacteriana	Cheftel, 1995
Mermeladas	400 MPa, 10 a 30 min, 20°C	Elimina la presencia de hongos y levaduras, facilita la penetración de azúcar y la formación de geles	Cheftel, 1995, Boulfer, 2012.
Yogur, salsas, gelatinas de frutas, geles	400 MPa, 10 a 30 min, 20°C	Pasteurización, facilita la penetración de azúcar y la formación de geles	Cheftel, 1995
Lechuga y tomate	300 MPa, 10 min, 20°C	Reduce la población microbiana	Arroyo et al., 1997

Fundamento de la APH

El uso de altas presiones hidrostáticas se rige fundamentalmente por dos principios. El primero es el principio de Le Chatelier, que postula que la alta presión desplaza el equilibrio de un proceso hacia el estado que ocupa menos volumen, es decir, la presión favorece fenómenos como la transición de fase o cambios en la configuración molecular. La presión es una variable termodinámica importante debido a que afecta el volumen de un sistema biológico y por consecuencia afecta una variedad de estructuras biológicas, reacciones y procesos.

El segundo es la ley de Pascal, que indica que una presión externa aplicada a un fluido confinado en un recipiente se transmite de forma uniforme e instantánea en todas direcciones.

Siguiendo este último principio esta tecnología es aplicable a alimentos líquidos o cualquier producto envasado en un empaque sellado herméticamente, pues si la muestra

permanece en contacto directo con el medio de presurización la presión es instantánea y uniforme independientemente del tamaño o la geometría del producto. (Oxen & Knorr, 1993), conservando su forma original independientemente del tamaño, forma y volumen del producto procesado (Téllez-Luis et al., 2001; Velazquez et al., 2005). Las ventajas y desventajas de la APH se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Ventajas y desventajas de método de conservación por alta presión hidrostática. Modificada de (Téllez-Luis et al., 2001).

Ventajas de APH	Desventajas de APH
<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de riesgo por contaminación del alimento en los equipos de APH • Permite procesar distintos tipos de alimentos sin necesidad de limpiar la cámara tras cada operación efectuada. • No se altera el sabor del alimento • No se altera el color debido a que la APH no favorece la reacción de Maillard • Alternativa ideal para productos frescos que necesitan temperatura ambiente o de refrigeración. • No produce residuos, ya que se utiliza agua como medio de presurización • Reduce la necesidad de conservadores 	<ul style="list-style-type: none"> • Los equipos de APH son caros • No se han podido diseñar procesos continuos • Algunos alimentos no pueden ser procesados por APH ya que perderían su forma y aspecto original • Existe desconfianza por parte del consumidor, debido a que el proceso aún es desconocido y novedoso.

Efecto de la APH sobre la conformación de enzimas

El estado nativo de una enzima es estabilizado por diferentes tipos de interacciones como puentes disulfuro, puentes de hidrógeno, interacciones de van Der Waals, interacciones

hidrofóbicas y electrostáticas. Las altas presiones no afectan los enlaces covalentes de las proteínas por lo tanto conservan la estructura primaria de las enzimas (Fellows, 2009). Sin embargo, las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria se ven modificadas por alteraciones en las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, además de los puentes de hidrógeno, que pueden provocar la reordenación de la estructura de la proteína que tiende a cambiar la forma para reducir su volumen.

Mecanismo de inactivación de enzimas por APH

La inactivación enzimática provocada por la alta presión hidrostática es un fenómeno complejo, ya que envuelve una serie de eventos como la formación y la ruptura de diferentes interacciones, cambios en la estructura nativa por despliegue o plegamiento de las enzimas. El mecanismo de inactivación enzimática provoca desdoblamiento parcial o completo como se muestra en la Figura 4 que pueden ser reversibles (R) o no (I) debido a la presión aplicada. Estos cambios afectan principalmente la actividad enzimática ya que está relacionada con la estructura nativa de la enzima (Chakraborty et al., 2014).

A pesar de que la inactivación de las enzimas depende de su naturaleza y el medio de reacción, se considera en general, que, a presiones bajas, e.g., 200 MPa, los despliegues en enzimas pueden ser reversibles mientras que por encima de 200 MPa los cambios son irreversibles. Sin embargo, el repliegue de las subunidades puede ocurrir de tal manera que la estructura de la enzima quede modificada y no funcione como se espera (Chakraborty et al., 2014).

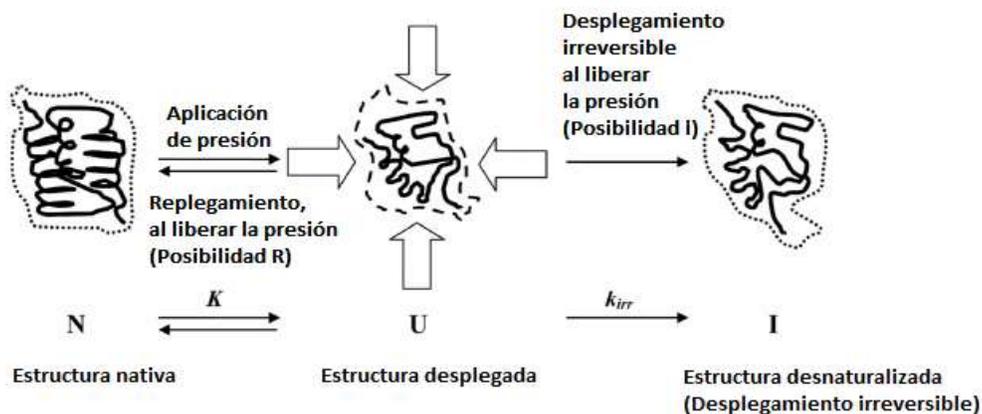


Figura 4. Modelo propuesto para los efectos de la alta presión sobre la conformación de la estructura enzimática (Chakraborty et al., 2014).

Cuando la presión que se ejerce en las enzimas es suficientemente alta, la fuerza que empuja las moléculas de agua que rodean a la enzima hacia el interior de la estructura globular de la enzima, ocupando pequeñas cavidades dentro de la enzima que provoca un debilitamiento en su estructura terciaria porque se empieza a perder la interacción hidrófoba que mantiene la estabilidad de la enzima, al mismo tiempo que se van generando enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua con algunos aminoácidos, debilitando también los enlaces de hidrogeno intramoleculares. Cuando la presión es muy alta, las enzimas no son capaces de estabilizar la estructura globular y llega a una conformación completamente desestructurada. (Perezan, 2015)

Calorimetría de barrido diferencial

La calorimetría de barrido diferencial (DSC por sus siglas en inglés) es una técnica de análisis térmico comúnmente utilizada que permite detectar transiciones que implican intercambio de energía, ya sea almacenando, procesos endotérmicos, o liberando calor, procesos exotérmicos, en función del tiempo y de la temperatura.

Algunos ejemplos de procesos que pueden ser determinados mediante DSC son:

- Temperaturas de transición vítrea
- Puntos de fusión y ebullición
- Tiempo y temperatura de cristalización
- Porcentaje de cristalinidad
- Calor específico
- Estabilidad oxidativa
- Cinéticas de reacción
- Pureza de compuestos
- Estabilidad térmica

Para estudiar la desnaturalización de enzimas la DSC resulta muy útil porque permite obtener propiedades termodinámicas de las transiciones pliegue-despliegue de

proteínas. En esta técnica la enzima se disuelve en un buffer de pH óptimo a una concentración conocida y se somete a un barrido de temperatura (T). Se obtiene un termograma en el que se registra el cambio de flujo de calor (Q) con respecto a la disolución amortiguadora sin enzima que sirve como referencia. La señal Q vs T se transforma en una gráfica de C_p^{exceso} vs T como se muestra en la Figura 5.

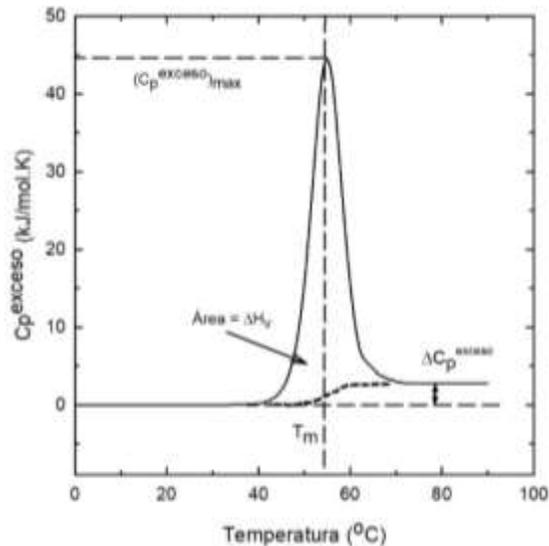


Figura 5. Representación esquemática del cambio en la capacidad calorífica en exceso con la temperatura para la desnaturalización térmica de una proteína disuelta en buffer (Robertson & Murphy, 1997).

La capacidad calorífica de exceso es la capacidad de la proteína, es decir: $C_p^{\text{exceso}} = C_p^{\text{proteína}} - C_p^{\text{buffer}}$, la capacidad calorífica de exceso máxima $(C_p^{\text{exceso}})_{\text{max}}$ ocurre cerca de la temperatura de transición de la proteína (T_m) donde se asume que la mitad de la cantidad de proteína está en estado nativo y la otra mitad en estado desnaturalizado. El área bajo la curva es igual a la entalpía de desnaturalización (ΔH_v) y el desplazamiento de la línea base proporciona la diferencia de capacidad calorífica en exceso ($\Delta C_p^{\text{exceso}}$) (Robertson & Murphy, 1997).

Los valores de T_m , $\Delta H_v(T_m)$ y $\Delta C_p^{\text{exceso}}$ permiten calcular $\Delta G(T)$ y $\Delta S(T)$ para obtener todos los datos termodinámicos necesarios para poder describir la desnaturalización de las enzimas (Anexo C).

Fundamento de la DSC

La calorimetría de barrido diferencial consiste en calentar una muestra de interés (M) y un compuesto de referencia (R) de tal manera que la temperatura sea la misma en M y R, aplicando velocidades de calentamiento, en °C/s, uniformes a la muestra y a la referencia para realizar el barrido de temperatura. Los resultados se presentan en forma de termogramas, i.e., gráficos de flujo de energía vs. temperatura (Suriñach et al., 1992). Para poder identificar el tipo de transición que se obtiene, es necesario realizar técnicas experimentales complementarias que permitan rectificar las conclusiones obtenidas de los termogramas de DSC.

CAPITULO II

JUSTIFICACIÓN

La industria de alimentos está en búsqueda constante de tecnologías innovadoras que permitan poner en el mercado productos más naturales, frescos, seguros y que dichas tecnologías sean amigables con el medio ambiente. Uno de los desarrollos de mayor éxito en el siglo XXI ha sido el proceso de conservación de alimentos por alta presión hidrostática (APH). Esta tecnología adquirió importancia en las últimas décadas y se comenzaron a realizar estudios sobre los componentes de los alimentos, principalmente en microorganismos, enzimas y las modificaciones que se producen a nivel nutricional y sensorial.

Es favorable que las enzimas hidrolasas mantengan su estabilidad al ser tratadas por APH debido a que juegan un papel importante como aditivos en la industria alimentaria, por ejemplo;

- Proteasa (rompe el enlace peptídico que une a los aminoácidos de las proteínas): Utilizadas para conferir cuerpo y sabor a la cerveza, aumentar la textura y volumen del pan, en la producción de quesos para generar sabores en la maduración, también se utilizan para ablandar productos cárnicos, que han sido los principales beneficiados con esta tecnología, pues permite mantener la frescura, calidad sensorial y nutricional de estos productos. Jamón, cortes de pollo o pavo, y platos listos para su consumo inmediato son algunos de los productos que se pueden encontrar actualmente en el mercado utilizando la tecnología de APH.
- Inulinasa, lactosa o pectinasa son enzimas que actúan sobre los polisacáridos y su uso en la industria es amplio, por ejemplo, en jugos para su clarificación, en la leche deslactosada o en productos vegetales, que también forman parte de la gama de alimentos tratados por APH,

Así como hay enzimas que buscamos inactivar a través de los métodos de conservación, también hay otras enzimas que se utilizan como ingrediente para obtener características fundamentales que son posibles gracias a su catálisis. Es por eso que se necesita de

investigaciones que permitan conocer las condiciones de APH donde podemos mantener estables estas enzimas para obtener resultados óptimos en la aplicación de los alimentos a nivel industrial.

Hipótesis

Las hidrolasas, endoinulinasa de *Aspergillus niger* y endoproteasa (Subtilisina Carlsberg) de *Bacillus licheniformis* mantendrán su estructura tridimensional sin afectar la actividad enzimática antes y después del tratamiento con APH.

Objetivo principal

Evaluar la estabilidad de las enzimas endoinulinasa y endoproteasa tratadas por APH para conocer su resistencia al tratamiento.

Objetivos particulares

- Verificar las condiciones óptimas de reacción reportadas de la endoinulinasa y endoproteasa, para trabajar a la máxima actividad catalítica.
- Determinar los parámetros termodinámicos (ΔH , ΔS , ΔC_p y T_m) de endoinulinasa y endoproteasa para evaluar su estabilidad después de ser tratadas por APH.
- Identificar la temperatura de transición, i.e., despliegue de las enzimas, y su posible reversibilidad mediante un estudio de calorimetría de barrido diferencial a presión constante para conocer su comportamiento térmico en medio acuoso.
- Estudiar el efecto de APH sobre la actividad enzimática de la endoinulinasa y la endoproteasa, para establecer los niveles de presión y tiempo de exposición que afectan dicha actividad.

CAPITULO III

METODOLOGÍA

Cuadro 4. Reactivos y equipo

Reactivos		Equipos
Inulinasa de <i>Aspergillus niger</i> en disolución acuosa de glicerol, Novozym 960 (Sigma-Aldrich, USA)	Proteasa de <i>Bacillus licheniformis</i> (ENMEX, México)	Columna Superdex 200 de 24 mL (Empacada en el L-314)
Fosfato monobásico (J T. Baker, España)	Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich, USA)	MICRODSC 7 EVO I y EVO II, (Setaram, Francia)
Inulina de Achicoria (Sigma-Aldrich, USA)	Acetato de sodio (Sigma-Aldrich, USA)	FPLC (ÄKTApurifier, GE Healthcare, USA)
Ácido acético (Merck, USA)	Ácido Sulfúrico (Mallinckrodt, Reino Unido)	Equipo para electroforesis sds page (Bio-Rad, USA)
Etanol (J T. Baker, España)	Orcinol (Sigma-Aldrich, USA)	Vórtex
Reactivo Bradford (Bio-Rad, USA)	BSA (Research Organics)	Espectrofotómetro (GE Healthcare, EE.UU)
ácido dinitro-salicílico (DNS) (Sigma-Aldrich, USA)	inulina de Achicoria (Sigma-Aldrich, USA)	Incubadora (Eppendorf ThermoMixer C, EE. UU)
Acetona (J T. Baker, España)	Fructosa (Sigma-Aldrich, USA)	Equipo de altas presiones hidrostáticas (ELMHURST SYSTEMS ENGINEERING, USA)
L-tirosina (Sigma-Aldrich, USA)	Caseína Láctica (MEYER, México)	Empacadora al vacío (mini Jumbo DS, Henkelman, Países Bajos).
Ácido tricloroacético (Mallinckrodt, Reino Unido)	reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, USA)	Liofilizadora (Labconco)

Carbonato de sodio (Sigma-Aldrich, USA)	Fosfato de potasio (Sigma-Aldrich, USA)	
Acetato de calcio (Sigma-Aldrich, USA)		

1. Obtención de las enzimas endoinulinasa y endoproteasa

- Se usó la endoinulinasa comercial Novozym 960 producida por *Aspergillus niger*. La enzima fue purificada antes de ser analizada, porque la presentación comercial contiene la mezcla de exoinulinasa y endoinulinasa.
- Se usó la preparación comercial endoproteasa ENMEX que corresponde a la Subtilisina Calsberg (SC) producida por *Bacillus licheniformis*.

2. Purificación de la Inulinasa

La endoinulinasa en disolución acuosa de glicerol se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular con una columna Superdex 200 de 24 mL con un flujo de 0.5 mL/min a una presión máxima de 0.80 MPa. La fase móvil fue buffer de fosfatos 0.05 M, pH 7.5, 0.5 M NaCl. Se recuperaron las fracciones 14 y 15 y se dializaron en una membrana de celulosa de 12 000 Da en buffer de acetatos 50 mM, pH 7.5 por 24 h a 4 °C. Posteriormente, las fracciones fueron liofilizadas. La purificación de la inulinasa fue monitoreada mediante electroforesis SDS-PAGE. Para ello se utilizó un gel de acrilamida al 10 %, se cargaron 10, 20, 30 y 40 µL de muestra y se corrió el gel a un voltaje constante de 75 V. La masa molar de las proteínas obtenidas se estimó comparándola con un estándar de masa molar conocida.

Enseguida, la reacción enzimática de la inulinasa purificada fue monitoreada por cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés). Se utilizaron placas de sílica en aluminio de 5 x 10 cm, y una mezcla de butanol, metanol y agua (3:2:1) como fase móvil. Las muestras se revelaron con una disolución de H₂SO₄ al 5 % en etanol con 10 mg/mL de orcinol, por aspersion, y posteriormente las placas se calentaron a 90 °C hasta que se revelaron.

3. Determinación de la cantidad de proteína soluble de inulinasa

La concentración de proteína soluble se determinó empleando el método de Bradford (1976). A 100 µL de muestra se agregaron 5 mL de reactivo de Bradford y se dejó reposar por 5 min. La mezcla se agitó en un vórtex durante 15 s. La absorbancia se leyó a 595 nm. Como blanco se utilizó agua destilada; 5 mL de reactivo de Bradford y 100 µL de agua, y se preparó una curva de calibración con albúmina de suero bovino como estándar en concentraciones de 0.0 a 1.0 mg/mL, las cuales se trataron bajo las mismas condiciones.

4. Determinación de la actividad enzimática

4.1 Endoinulinasa

Se construyó la curva patrón de fructosa para medir la concentración de azúcares reductores por el método de ácido dinitro-salicílico (DNS) (Miller, 1959). Se determinó la actividad enzimática residual en inulina de Achicoria a 50 °C utilizando buffer de acetatos 0.05 M a una concentración de 0.5 g/ 100 mL. Se usaron 5 µL de enzima y 1000 µL de disolución estándar de inulina a diferentes tiempos de reacción; 0, 10, 20, 30, 40 y 60 min, a 350 rpm. La reacción se detuvo por congelamiento en un baño de acetona/hielo seco. Se midió la concentración de azúcares reductores por el método DNS. La actividad enzimática se definió como UI; cantidad de enzima cruda que cataliza un µmol de fructosa/min.

4.1.1 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de la endoinulinasa

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se examinó incubando la disolución enzimática en un intervalo de 27 a 93 °C. Se usó una disolución estándar de inulina 0.5 g en 100 mL disuelta en buffer de acetatos 0.05 M, pH 5. El efecto del pH se determinó incubando a 50 °C la disolución enzimática utilizando varias disoluciones de inulina 0.5 g en 100 mL disuelta en buffer de acetatos en un intervalo de pH de 3.5 a 6.0 y buffer de fosfatos en un intervalo de pH de 7.0 a 9.0.

4.2 Endoproteasa

Se siguió la metodología de Sigma Aldrich, (2008) (<https://www.jove.com/video/899>). Se construyó la curva patrón de L-tirosina a partir de 0.2 mg/mL debido a que la endoproteasa hidroliza la caseína y el aminoácido tirosina es liberado junto con otros aminoácidos y fragmentos peptídicos. Se determinó la actividad enzimática en caseína 0.65 mg en 100 mL a 37 °C por 10 min, se añadió ácido tricloroacético (TCA) 0.11 M para detener la reacción, se agregó carbonato de sodio para regular el pH y una disolución de reactivo de Folin-Ciocalteu. Posteriormente se midió la absorbancia a 660 nm.

4.2.2 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de la endoproteasa

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se examinó incubando la disolución enzimática en un intervalo de 27 a 97 °C. Se usó una disolución estándar de caseína láctica 0.65 mg en 100 mL de buffer de fosfato de potasio 50 mM y la endoproteasa disuelta en buffer de acetato de sodio 10 mM con acetato de calcio 5 mM, pH 7.5. El efecto del pH se determinó incubando a 37 °C la disolución enzimática utilizando varias disoluciones de caseína láctica 0.65 mg en 100 mL de buffer de fosfato de potasio 50 mM y la endoproteasa disuelta en buffer de acetatos en un intervalo de pH de 3.5 a 6.0 y buffer de fosfatos en un intervalo de pH de 7.0 a 9.0.

5. Preparación de muestras

La inulinasa se disolvió en buffer de acetatos 50 mM, pH 5, en una concentración de 0.5 g/100 mL de disolución. La endoproteasa se disolvió en un buffer de acetato de sodio 10 mM con acetato de calcio 5 mM, pH 7.5

6. Análisis térmico

El análisis térmico se realizó por DSC (MicroDSC 7 EVO I y EVO II, Setaram, Francia). Los termogramas se obtuvieron a una tasa de barrido de 0.8 y 1.2 °C/min con ciclos de temperatura de 20-120-20 °C. Se calcularon los valores térmicos de entalpía, temperatura de desnaturalización, cambio de la capacidad calorífica (C_p^{exceso}) con la temperatura, entropía y energía libre de Gibbs (Anexo C). Se tomaron las disoluciones preparadas en

el punto anterior y se pesaron 600 ± 5 mg de endoinulina y en la celda de referencia se colocó el buffer de acetatos 0.05 M pH.

Se realizó un ensayo con el buffer para verificar que no afectara en la señal de las pruebas con la enzima y determinar la diferencia de capacidad calorífica.

Para la endoproteasa se pesaron 800 ± 5 mg de la disolución preparada en el punto 5 y en la celda de referencia se colocó el buffer de acetato de sodio 10 mM con acetato de calcio 5 mM, pH 7.5, de la misma manera se realizó un ensayo con el buffer para determinar C_p^{exceso} .

7. Tratamiento de las enzimas por alta presión hidrostática

Para el tratamiento de las enzimas en disolución se utilizó un sistema de altas presiones hidrostáticas (Elmhurst Systems Engineering, EE. UU). Para ambas enzimas se realizaron dos tratamientos a diferentes presiones, el primero a 400 MPa y el segundo a 600 MPa, cada presión se aplicó por 5 min.

Se tomaron 0.6 mL de la disolución de inulina y 1.6 mL de la disolución de endoproteasa. Se colocaron en tubos Eppendorf dentro de una bolsa de polietileno de 10 cm de largo y 8 cm de ancho que se selló al vacío (mini Jumbo DS, Henkelman, Países Bajos).

Las muestras tratadas por APH se examinaron por DSC y se determinó su actividad enzimática para comparar ambos tratamientos de APH.

8. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para un valor de $p < 0.05$ para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos a los que se sometieron ambas enzimas. Para realizar el análisis se tomó en cuenta la actividad enzimática después de cada tratamiento. Cuando se encontró alguna diferencia estadística se aplicó la prueba de Dunnett con $\alpha = 0.05$ para comparar los tratamientos contra un control y la prueba de Tukey con $\alpha = 0.05$ para hacer todas las posibles comparaciones entre los tratamientos (Wong González, 2010).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Purificación de inulinasa por exclusión molecular

Se utilizó la mezcla comercial Novozyme 960 la cual reporta que contiene endoinulinasa de *Aspergillus niger* y en menor proporción exoinulinasa de acuerdo con investigaciones previas llevadas a cabo por otro grupo de trabajo (Rodríguez-Solís, 2018; Trapala Reyna, 2017). La Figura 6 muestra el cromatograma de exclusión molecular de la endoinulinasa.

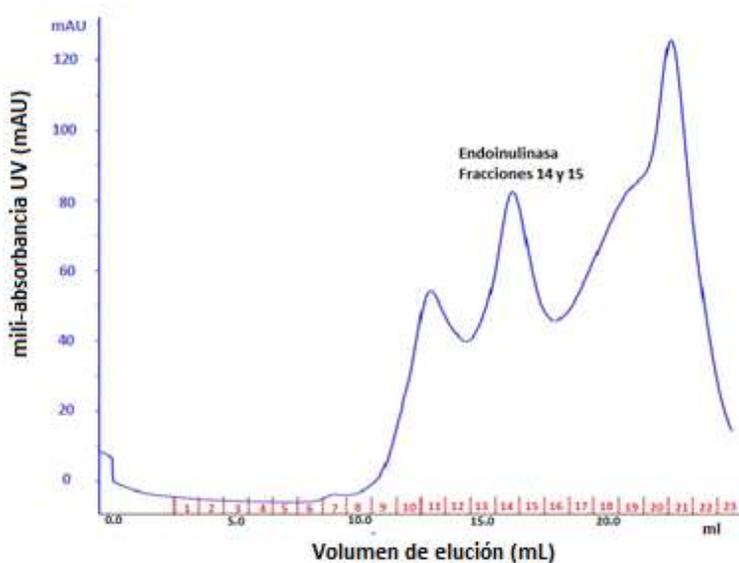


Figura 6. Cromatograma de la purificación de inulinasa por exclusión molecular.

En el cromatograma se observan tres picos cuya presencia indica que la forma comercial de la enzima es una mezcla de proteínas. Se tomaron todas las fracciones eluidas para determinar la cantidad de proteína y medir su actividad enzimática, con el propósito de determinar la endoinulinasa de interés. Una vez determinadas la actividad enzimática y la concentración de proteína se encontró concentración de proteína en los tres picos y actividad en los primeros dos, i.e., fracciones 10-11 y 14-15, por lo que se decidió trabajar con estas dos fracciones para identificar las dos inulinasas.

1.1. Seguimiento de la purificación por electroforesis SDS-PAGE

Se realizó la electroforesis SDS-PAGE de las dos fracciones para confirmar su pureza y conocer su correspondiente masa molar.

En la Figura 7 se observa el gel de electroforesis de las fracciones 10 y 11 del primer pico que aparece en el cromatograma (Fig. 6). Se observa una banda entre 100-150 kDa y otra entre 75-100 kDa lo que significa que las fracciones no están puras.



Figura 7. Electroforesis de pico 1 (Fracciones 10 y 11). M: Marcador de masa molar, A: 40 μ L de fracción 10, B: 40 μ L de fracción 11.

En la Figura 8 se observa una banda entre 50 y 75 kDa que indica que las fracciones del segundo pico del cromatograma (Fig. 6) están puras. La masa molar estimada por SDS-PAGE para la endoinulinasa de *A.niger* (Novozyme 960) es 68.1 kDa (Taurai, 2007). Esto indica que la segunda fracción, 14 y 15, corresponde a la endoinulinasa.

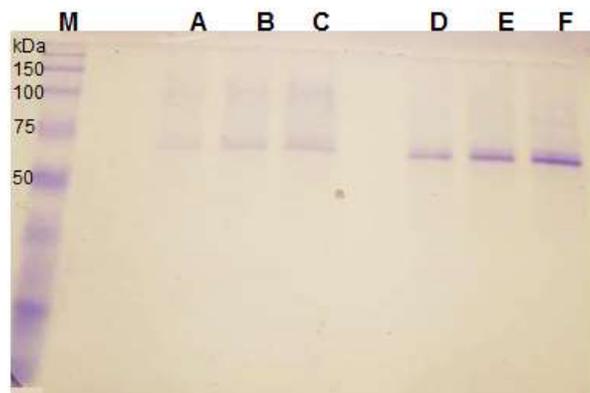


Figura 8. Electroforesis de las fracciones 14 y 15, pico 2, a diferentes volúmenes. M: Marcador de masa molar, A: 20 μ L de fracción 14, B: 30 μ L de fracción 14, C: 40 μ L de fracción 14, D: 20 μ L fracción 15, E: 30 μ L fracción 15, F: 40 μ L fracción 15.

1.2. Cromatografía en capa fina

Se realizó una cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés) para confirmar la presencia de la endoinulinasa en las fracciones 14 y 15 por medio de sus productos. En la Figura 9 en R2 se observa que hubo síntesis de FOS lo que indica la presencia de hidrolisis de la inulina por la endoinulinasa. Por otro lado, las fracciones 10 y 11 son capaces de producir FOS y fructosa o glucosa tal como se observa en R1, debido a que aún existe la mezcla de enzimas endoinulinasa y exoinulinasa.



Figura 9. I: Control de Inulina 0.5 %, F: Control de Fructosa 0.5%, R1: Reacción de fracción 10 y 11 con Inulina, R2: Reacción de fracción 14 y 15 con inulina.

2. Cuantificación de proteína soluble

La concentración de proteína en cada paso de la purificación se determinó por referencia a una curva patrón de BSA (1 mg/mL) (Anexo A: Figura A.1). El Cuadro 5 muestra los resultados.

Cuadro 5. Tabla de purificación de endoinulinasa

PASO	Volumen (mL)	Actividad Total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
Mezcla cruda	80	347	38.26	9	1.00	100.00
Dializada	80	248	18.9	13	1.44	71.47
Exclusión molecular	14	3723	12.48	298	33.11	1072.91

fragmentos peptídicos. El reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con la tirosina proveniente de los fragmentos peptídicos para producir un cromóforo de color azul cuantificable (Fig. 11). Los valores de absorción que genera la actividad de la endoproteasa se comparan con una curva patrón de L-tirosina (Anexo A. Figura A.3). A partir de esta curva se puede determinar la UI que es la cantidad de enzima que cataliza un μmol de tirosina liberada de la caseína por minuto.



Figura 11. Reacción entre la caseína y el reactivo de Folin.

3.2. Efecto de la temperatura y el pH, sobre la actividad enzimática de las hidrolasas

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la inulinasa en un intervalo de 27 a 93 °C. Se obtuvo una actividad específica máxima de 382.33 U/mg de proteína a 50 °C. En la Fig. 12 (A), se observa la variación de la actividad enzimática con el aumento de la temperatura. Temperaturas mayores de 70 °C resultaron en una pérdida de 80 % de la actividad enzimática debido a la desnaturalización térmica de la enzima. La Figura 12 (B) muestra la variación con la temperatura absoluta de la actividad enzimática promedio adimensional experimental (símbolos), así como las predicciones (línea continua) del modelo (Wojczyk & Milek, 2016)

$$a = \frac{e^{\left[\frac{(T_{opt} - T)\beta E_d}{RTT_{opt}(e^\beta - 1)} \right]} \left\{ 1 - e^{\left[-\beta e^{\left[\frac{E_d(T - T_{opt})}{RTT_{opt}} \right]} \right]} \right\}}{1 - e^{-\beta}}$$

La actividad enzimática promedio adimensional, a , es el cociente de la actividad enzimática promedio a la temperatura T entre la actividad enzimática promedio a la temperatura óptima. Esta ecuación tiene tres parámetros de regresión; T_{opt} (K), β (adimensional), y E_d (kJ). El modelo asume que la dependencia de la constante de reacción de la velocidad enzimática, k , y la constante de inactivación térmica de la enzima, k_d , varían con la temperatura de acuerdo con una relación de Arrhenius. De esta forma la constante k está asociada con una energía de activación, E_a , mientras que la constante k_d está asociada con una energía de inactivación, E_d . Además, el modelo considera que la tasa de desactivación de la enzima se acerca a la cinética de primer orden.

El parámetro β está definido por la expresión

$$\beta = t_a k_{d0} e^{\left(-\frac{E_d}{RT_{opt}}\right)}$$

donde t_a es el tiempo de duración de la reacción enzimática a una temperatura dada, $k_{d0} e^{(-E_d/RT_{opt})} = k_d$, y R es la constante de los gases (0.0083144 kJ/mol·K).

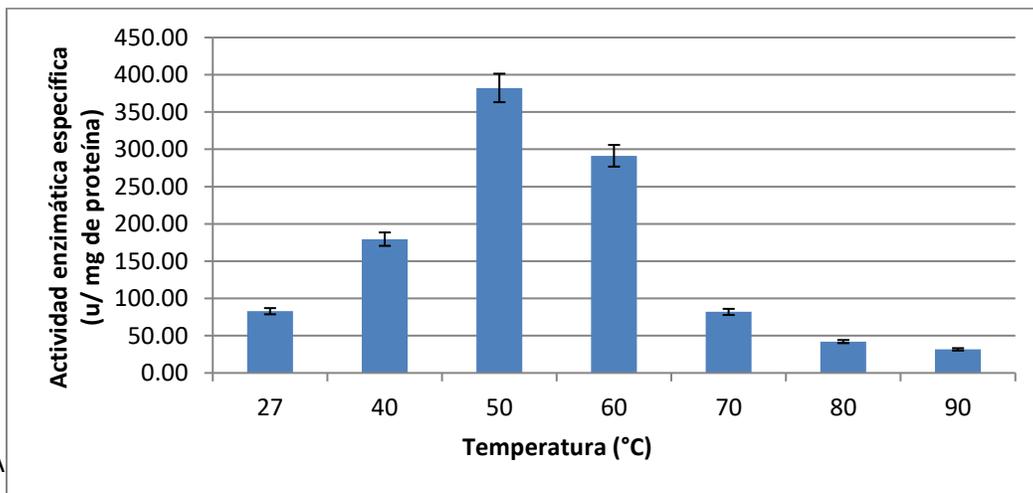


Fig. A

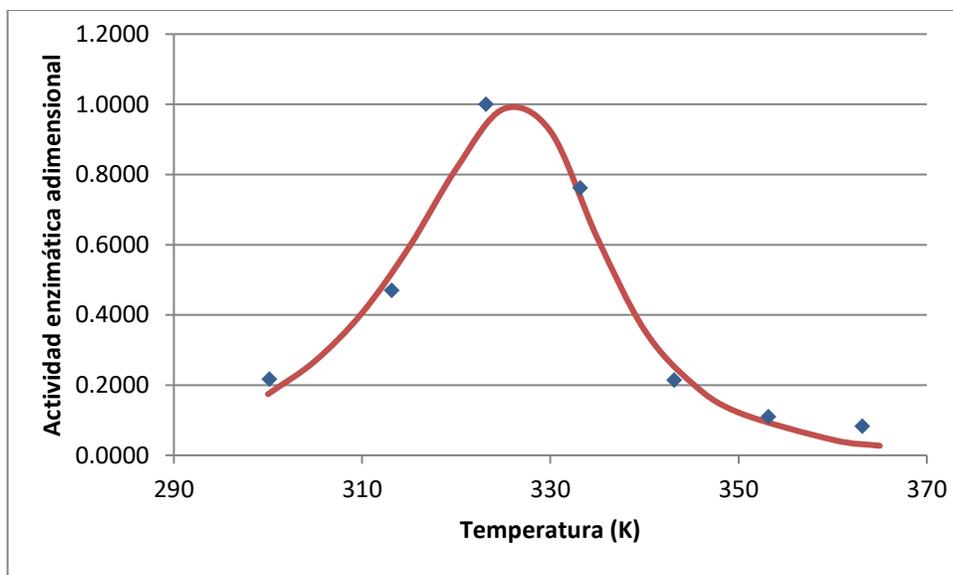


Fig. B

Figura 12. A: Actividad enzimática en disoluciones de inulina de 0.5 g en 100 mL de buffer de acetatos 0.05 M en función de la temperatura. B: Predicción de la actividad enzimática adimensional con la temperatura.

Los valores de regresión del modelo adimensional para la inulinasa son $T_{opt} = 326.5$ (K), $\beta = 0.9027$, y $E_d = 172.7$ kJ ($r^2 = 0.9834$; suma de cuadrados = 0.01245). La T_{opt} predicha por el modelo, 53.4 °C, es 6.4 % mayor que la T_{opt} experimental; 50 °C (Figura 12: A). El modelo predice satisfactoriamente el comportamiento térmico de la actividad de la inulinasa a pesar de que los grados de libertad (GL) de la regresión son relativamente bajos; $GL = \text{No. de pares de datos} - \text{No. de parámetros de regresión}$, es decir, $7 - 3 = 4$. Se esperaría que un número mayor de datos experimentales, sobre todo en la región de aumento de la actividad enzimática, resultaría en un mejor ajuste y por ende en una predicción más precisa.

De igual forma, la actividad enzimática de la endoproteasa se midió en un intervalo de 27 a 97 °C. Se obtuvo una actividad enzimática específica máxima de 381.02 U/mg de proteína a 57 °C y se observa un descenso considerable a partir de 67 °C de la actividad enzimática de 58 a 80 % (Fig.13 A1), lo que indica que la enzima comienza a desnaturalizarse a partir de 67 °C. La Figura 13 (B1).

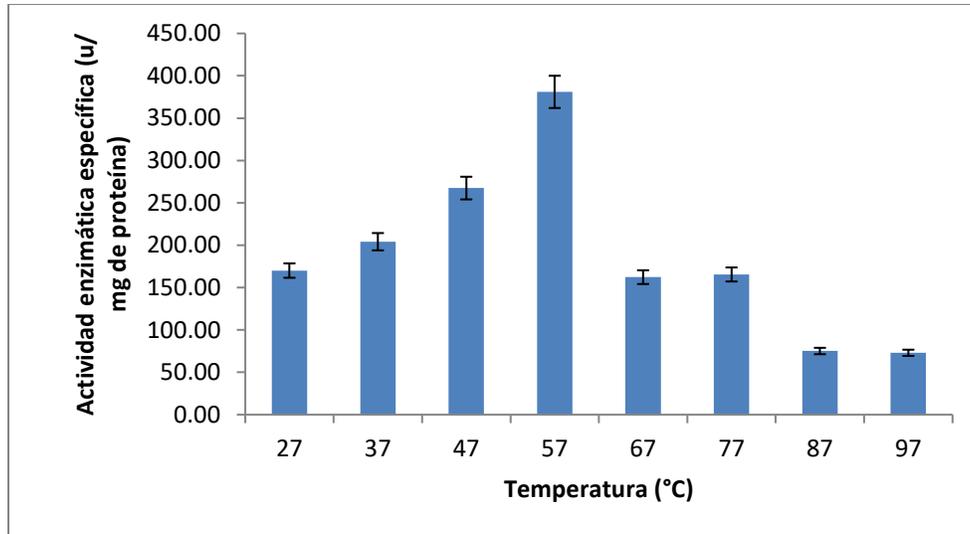


Fig .A1

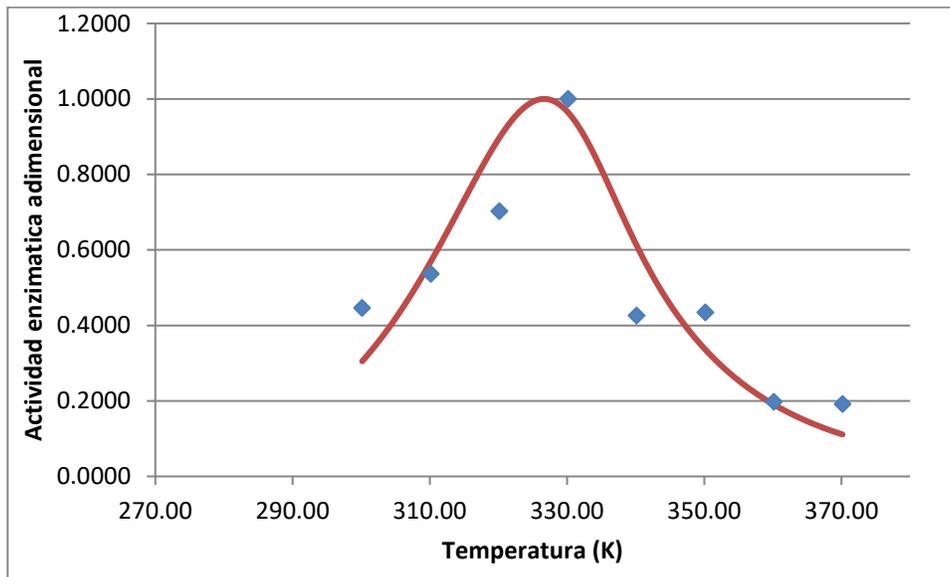


Fig .B1

Figura 13. Arriba: Actividad enzimática en caseína 0.65 mg/mL en buffer de fosfato de potasio 50 mM, y la endoproteasa disuelta en buffer de acetato de sodio 10 mM con acetato de calcio 5 mM, pH 7.5 en función de la temperatura. Abajo: Predicción de la actividad enzimática adimensional con la temperatura.

Al igual que para la inulinasa se hizo el ajuste de los datos de actividad enzimática con el modelo ya descrito. Los parámetros de regresión fueron en este caso; $T_{opt} = 327.7 \text{ K}$, $\beta = 1.043$, y $E_d = 110.9 \text{ kJ}$ ($r^2 = 0.9350$; suma de cuadrados = 0.0651). En este caso, el ajuste es menos preciso porque en la zona de aumento de la actividad enzimática la subestima a bajas temperaturas y la sobrestima a temperaturas más altas. No obstante, predice la

temperatura óptima con una desviación de 4.21 % dado que la experimental es de 57 °C y la predicha por el modelo es 54.6 °C. Más allá de la temperatura óptima el hecho de que las actividades enzimáticas experimentales son apenas 1.90 y 2.80 % entre 67-77 y 87-97 °C, respectivamente, contribuye a la menor capacidad de predicción del modelo para esta enzima.

Se evaluó el efecto del pH sobre la actividad enzimática para la endoinulinasa en un intervalo de 3.5 a 9.0. Se obtuvo una actividad específica máxima de 384.22 U/mg de proteína en un buffer de pH 5. En la Figura 14 se observa que en un intervalo de 4.5 a 6 los valores de la actividad específica no son tan bajos en comparación de pH muy ácidos o muy alcalinos. El pH puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie de la enzima, afectando sus propiedades catalíticas, causando su desnaturalización y en consecuencia su inactivación (Valero, 1998). En general, las enzimas requieren un pH óptimo en el cual la actividad enzimática es máxima y sus centros activos presentan una conformación iónica adecuada para realizar la hidrólisis de manera eficiente. En disoluciones muy ácidas o alcalinas las estructuras cuaternaria, terciaria o secundaria se pueden ver afectadas sufriendo una desnaturalización irreversible (Hicks, 2000).

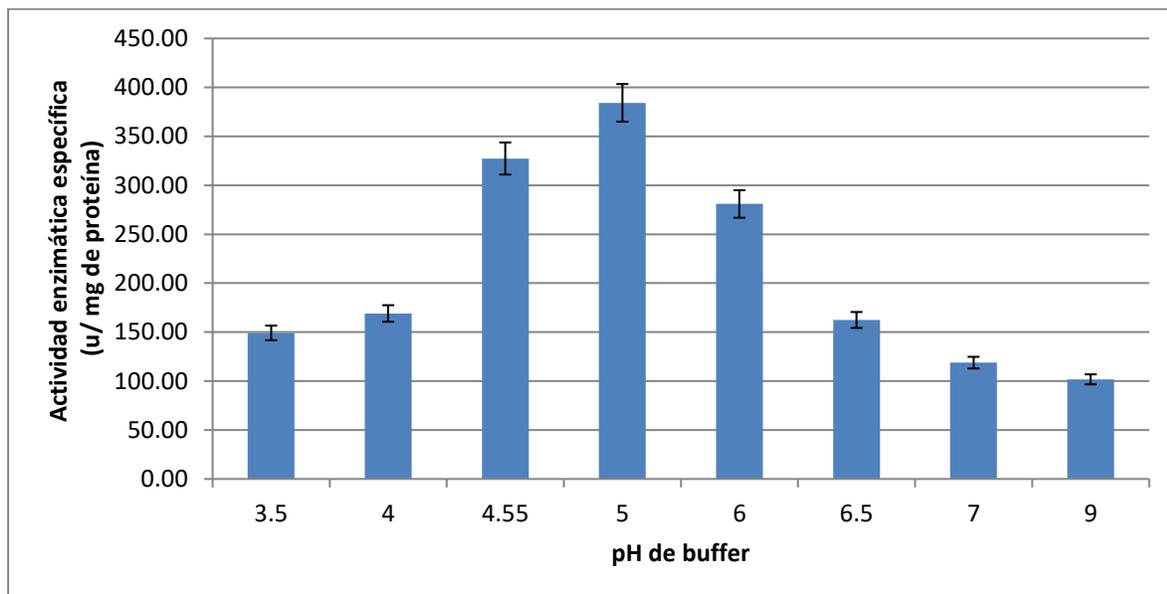


Figura 14. Actividad enzimática en disoluciones de inulina de Achicoria 0.5 g en 100 mL incubadas a 50 °C en función del pH en un intervalo de 3.49 a 9.01.

Por otro lado, se determinó la actividad enzimática de la endoproteasa a diferentes pH para determinar el óptimo. La enzima comercial es bacteriana alcalina por lo que se espera una mayor actividad enzimática a pH básico. Se obtuvo una actividad enzimática específica máxima de 324.27 63.47 U/mg de proteína a pH 7.5. Sin embargo, se puede trabajar en un intervalo de 6.5 a 8.5, ya que como se observa en la Figura 14 a pH menores de 6.5 la actividad baja 90 %, y a pH superior a 9 la actividad baja 50 %. Este comportamiento se debe a varios factores que afectan la actividad enzimática. Uno de ellos es el sustrato utilizado, dado que la caseína al ser una proteína se ve afectada por el pH del medio; a pH ácido se rompen los enlaces entre los grupos fosfato y el ion calcio al reducirse la ionización de los fosfatos (Calvo, 2004). A pH 4.5 las caseínas precipitan, y este fenómeno afecta considerablemente la actividad enzimática de la endoproteasa porque no se logra disolver la caseína a pH menor de 6.5.

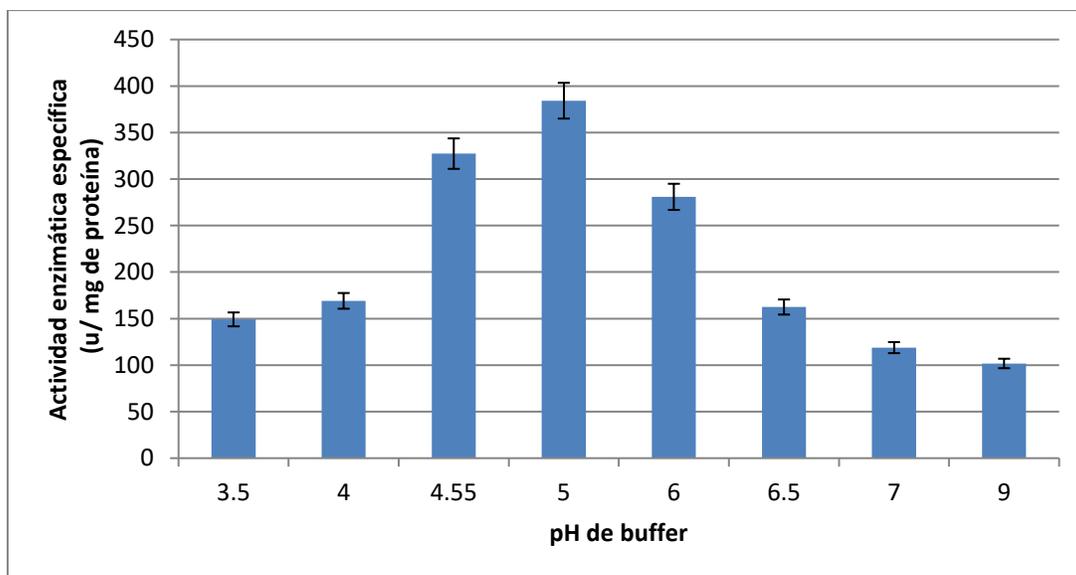


Figura 15. Actividad enzimática en caseína 0.65 mg/mL de buffer de fosfato de potasio 50 mM, incubadas a 37 °C en función de pH en un intervalo de 3.5 a 10.5.

4. APH y análisis térmico

El mecanismo de inactivación enzimática inducida por APH es un fenómeno hipotéticamente similar a la desnaturalización de proteínas, que puede inducir cambios reversibles, o irreversibles, y el despliegue parcial o total de la enzima nativa. Por lo que la actividad enzimática puede verse afectada (Chakraborty et al., 2014).

Se midió la actividad enzimática volumétrica después de los tratamientos de APH, el rendimiento fue 80 % a 400 MPa y 61 % a 600 MPa con respecto a la enzima control (Fig. 16), muy probablemente la endoinulinaasa tratada a 600 MPa ha perdido estabilidad en la estructura globular provocando que las moléculas de agua del buffer estén interactuando a nivel intermolecular con aminoácidos y las interacciones hidrófobas de la endoinulinaasa se estén perdiendo afectando a la actividad enzimática considerablemente.

Por otro lado, el análisis estadístico indica que si hay diferencia significativa entre la actividad enzimática de los tratamientos por APH y el control con 95% de confiabilidad (Anexo B).

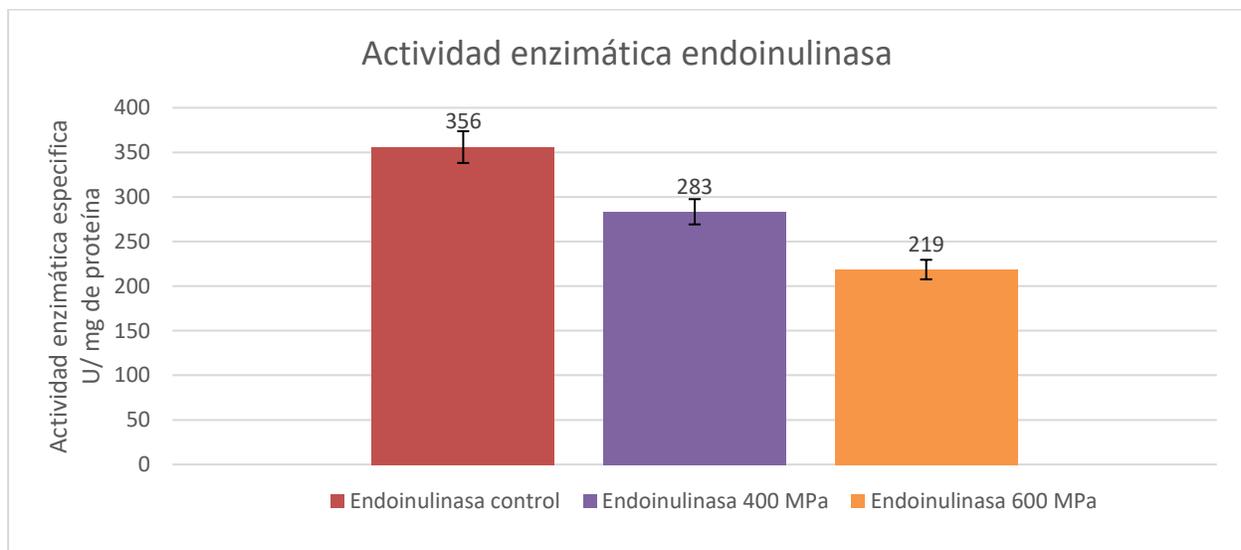


Figura 16. Actividad enzimática de la endoinulinaasa en disoluciones de inulina de 0.5 g/100 mL de buffer de acetatos 0.05 M, pH 5 a 50 °C, después de los tratamientos de APH (400 MPa y 600 MPa por 5 min)

Se hizo el análisis térmico en las mismas condiciones para las enzimas tratadas por APH y la enzima control con el fin de observar si existían cambios en la señal de transición y poder determinar parámetros termodinámicos que nos permitieran saber que tanto se afectaba a las enzimas. En los termogramas para endoinulinaasa (Fig. 17, 18 y 19) se presentan únicamente las transiciones del primer ciclo de calentamiento de 20°C a 120°C del DSC debido a que no se presentaron señales a partir del enfriamiento ni después del segundo ciclo de calentamiento, lo que indica que los despliegues de la endoinulinaasa control y las tratadas por APH son irreversibles. (Torabizadeh et al., 2011).

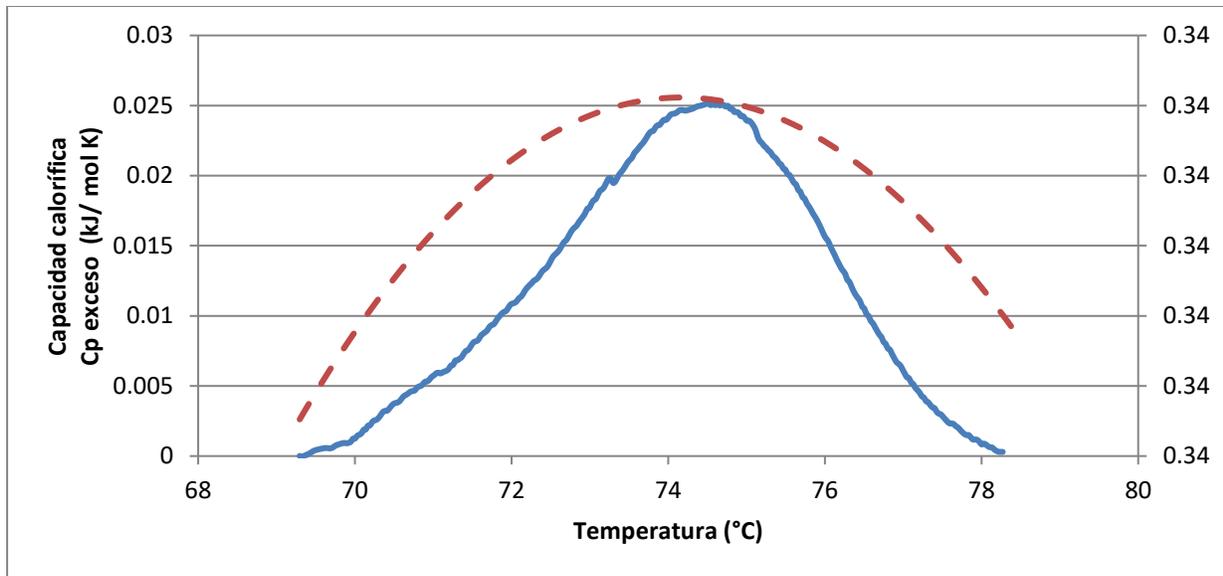


Figura 17. Variación con la temperatura de la capacidad calorífica de la endonuclease sin tratamiento por APH para una concentración de 8 g/100 mL en buffer de acetatos pH 5, a una tasa de 0.8 °C/ min. Línea punteada: transición predicha por la ecuación C6 (Anexo C).

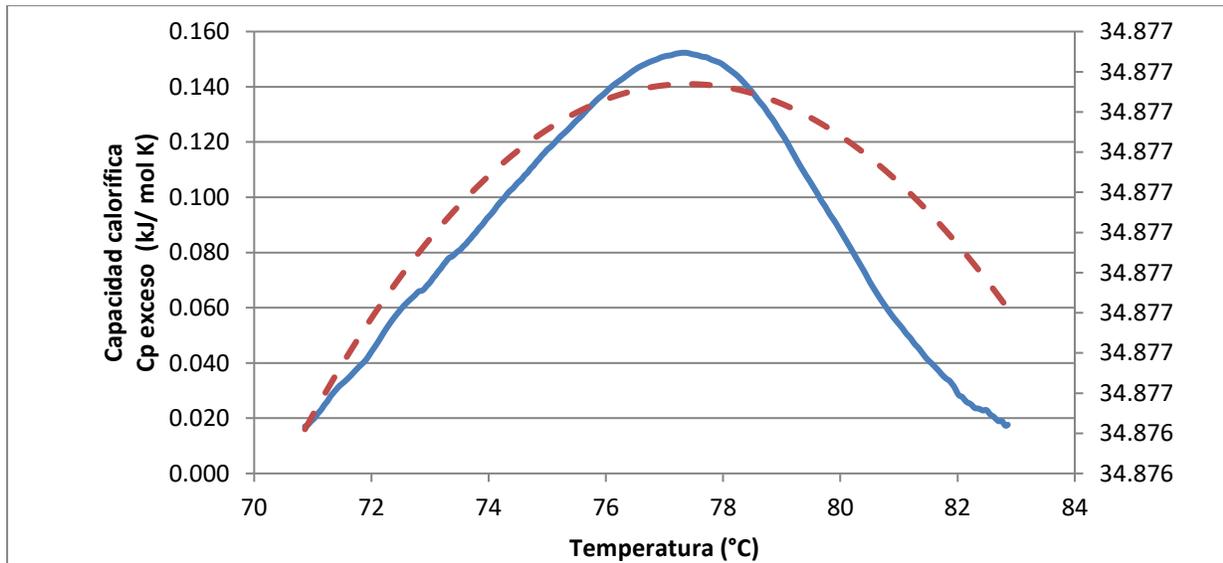


Figura 18. Variación con la temperatura de la capacidad calorífica de la endonuclease tratada a 400 MPa para una concentración de 8 g/100 mL en buffer de acetatos pH 5, a una tasa de 0.8 °C/ min. Línea punteada: transición predicha por la ecuación C6 (Anexo C).

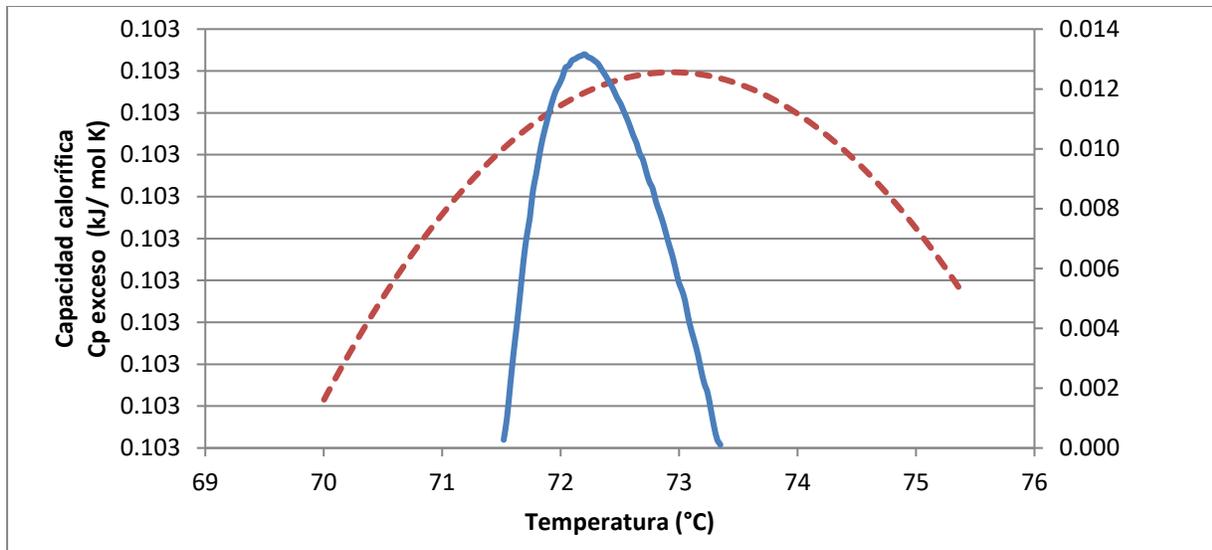


Figura 19. Variación con la temperatura de la capacidad calorífica de la endoinulinasa tratada a 600 MPa para una concentración de 8 g/100 mL en buffer de acetatos pH 5, a una tasa de 0.8 °C/ min. Línea punteada: transición predicha por la ecuación C6 (Anexo C).

Las señales para la inulinasa (Figs. 18 y 19) mostraron picos endotérmicos en intervalos de temperatura de 71 a 83 °C y de 71.5 a 75.5 °C para los tratamientos a 400 y 600 MPa, respectivamente. Los intervalos de temperatura en la disolución de endoinulinasa sin tratamiento están entre 69 a 78 °C (Fig 17), sin embargo, después del tratamiento a 600 MPa hay una disminución en el intervalo de temperatura de transición que puede indicar una modificación en la estructura de la enzima, además en el cuadro 6 se observa una disminución en ΔH debido a que la enzima es menos estable ya que necesita menos energía para el proceso de inactivación, ΔC_p refleja que se necesita una mayor cantidad de energía para una solución de enzima nativa que para una tratada por APH y puede ser efecto de la reestructuración que tiene la enzima después del tratamiento de alta presión. ΔS después de los tratamientos de APH son menores probablemente porque hay menos repulsión de cargas derivado de la modificación de la estructura nativa. Para la endoinulinasa control, ΔG es positiva cuando $T < T_m$ es decir la desnaturalización no es espontánea por lo que es necesario suministrar energía para llevarla a cabo a diferencia de las enzimas tratadas por APH que ΔG es negativo por lo tanto es una desnaturalización espontánea, y al momento de $T > T_m$ los valores de ΔG para la enzima control es negativo

y para las que fueron sometidas a APH es positivo. En T_m , ΔG es igual a 0 debido al equilibrio entre estado nativo y desnaturalizado en los tres casos.

Cuadro 6. Propiedades termodinámicas de la endoinulinasa tratada por APH y la endoinulinasa sin tratamiento (control), obtenidas a partir de los termogramas de DSC (Anexo C).

Muestra	ΔH	ΔC_p	T_m	Temperatura inicial (Onset)		T_m		Temperatura final (Offset)	
				ΔG	ΔS	ΔG	ΔS	ΔG	ΔS
Control	0.0926	-1.82E-06	74	0.00130	0.000267	0.00	0.000267	-0.000921	0.000267
400	-2.06	-0.000375	77	-0.0362	-0.00588	0.00	-0.00588	0.0321	-0.00589
600	-2.79	-0.00189	73	-0.0162	-0.00805	0.00	-0.00806	0.00131	-0.00806

$\Delta H = \text{kJ/mol}$, $\Delta S = \text{kJ/mol}\cdot\text{K}$; $\Delta G = \text{kJ/mol}$; $\Delta C_p = \text{kJ/mol}\cdot\text{K}$. $T_m = ^\circ\text{C}$

Por último, se hizo un análisis teórico de la desnaturalización de las enzimas (Anexo C) que se determinó con uno de los modelos Lumry-Eyring para conocer si la desnaturalización de la endoinulinasa que se está llevando a cabo es en dos pasos, es decir si pasa de una estructura nativa a una desnaturalizada o tiene intermediarios. Sin embargo, en las Figuras 17, 18 y 19 se observa que no se sigue el mismo comportamiento de lo que se obtuvo experimentalmente con el modelo teórico donde marca dos estados únicamente y que este proceso es reversible, que, comprobamos con el segundo ciclo de DSC donde no hubo señal que indicara que el desdoble de la enzima fuera reversible, por lo tanto, sería necesario hacer un barrido a diferentes tasas de velocidad de calentamiento para tomar en cuenta modelos más complejos.

En el caso de la endoproteasa, se determinó la actividad enzimática volumétrica en cada tratamiento (Fig. 20) con el fin de observar si los cambios en la conformación de la endoproteasa provocados por la APH afectan de manera considerable la producción de Tirosina. Se observó que a 400 MPa se pierde 10 % de la actividad tomando en cuenta la actividad enzimática de la endoproteasa control y a 600 MPa se pierde el 30 % la actividad enzimática. La estructura globular de la enzima a pesar de tener un posible rearrreglo debido al aumento de presión al igual que la endoinulinasa se mostró más resistente a la presión y es por eso que la actividad enzimática baja un 10% menos que en la endoinulinasa.

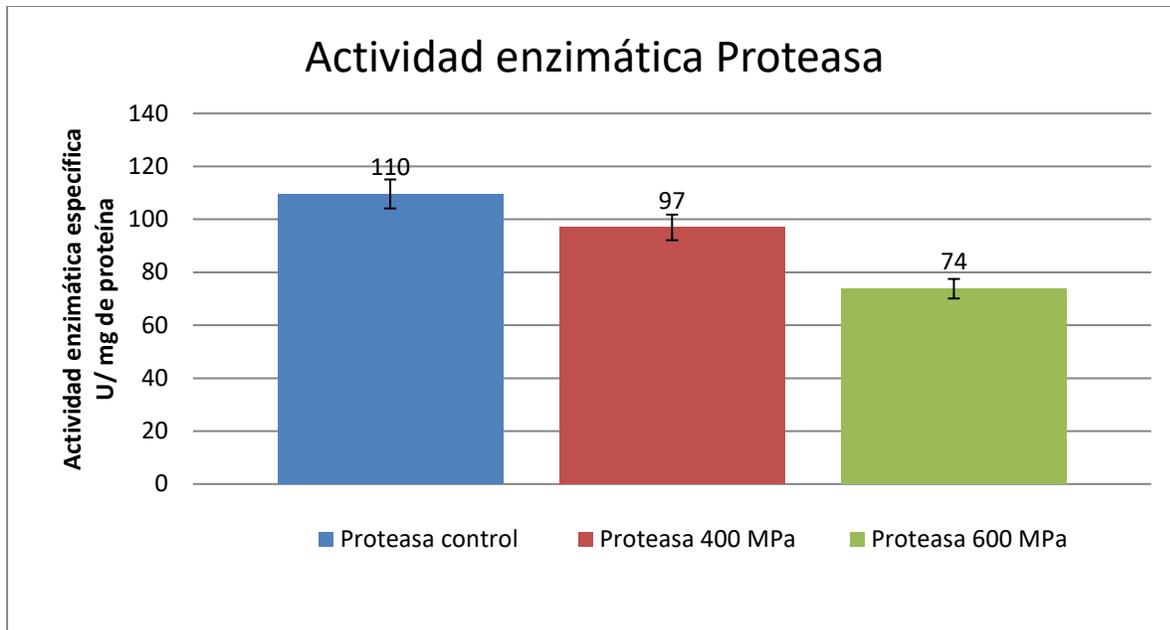


Figura 20. Actividad enzimática de la endoproteasa en disoluciones de caseína 0.65 mg/mL en buffer fosfatos, pH 7.5, incubadas a 37 °C, después de los tratamientos de APH (400 MPa y 600 MPa por 5 min).

Para la endoproteasa control que fue sometida a DSC, los termogramas mostraron una transición en un intervalo de temperatura de 71 a 81 °C (Fig. 21) y después de aplicar el tratamiento de APH a 400 y 600 MPa por 5 min las pruebas de calorimetría en las mismas condiciones con las que se trabajó la enzima control se observaron picos endotérmicos en intervalos de temperatura de 72 a 84 °C y de 70 a 83 °C para 400 y 600 MPa por 5 min, respectivamente (Fig. 22 y 23). Al igual que la endoinulinasa los tratamientos de calorimetría fueron por dos ciclos de 20 a 120 a 20 °C, y en todos los casos la endoproteasa tampoco mostró transiciones en el enfriamiento ni en el segundo ciclo, por lo que se puede pensar que su desnaturalización tampoco es reversible, al igual que para la endoinulinasa se tomó en cuenta el mismo modelo de Lumry-Eyring, esperando que solo se tuvieran dos pasos en la desnaturalización de la endoproteasa, sin embargo las Fig. 21, 22 y 23 muestran que los datos experimentales no son idénticos a los teóricos y que sería necesario utilizar un modelo más complejo que indique que la desnaturalización no es reversible y existen intermediarios en el proceso.

En este caso el intervalo de temperatura de transición se mantuvo similar. Sin embargo, las propiedades termodinámicas (Cuadro 6) mostraron un aumento en ΔH en la enzima endoproteasa tratada por APH en comparación al control, es decir, podría haber una mayor interacción de enlaces débiles y existir la repulsión de cargas negativas o positivas presentes pues la ΔS también aumenta, debido al posible rearrreglo de la enzima después de los tratamientos por APH.

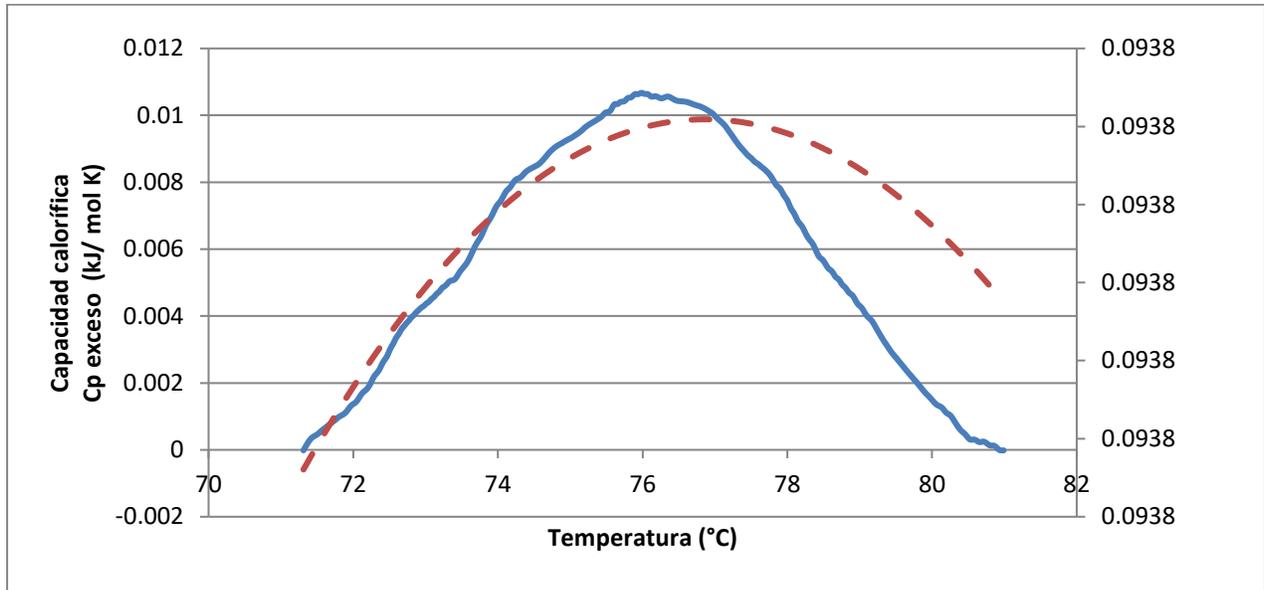


Figura 21. Variación con la temperatura de la capacidad calorífica de la endoproteasa sin tratamiento por APH para una concentración de 5 g/100 mL en buffer de fosfatos, pH 7.5, a una tasa de 1.2 °C/min. Línea punteada: transición predicha por la ecuación C6 (Anexo C).

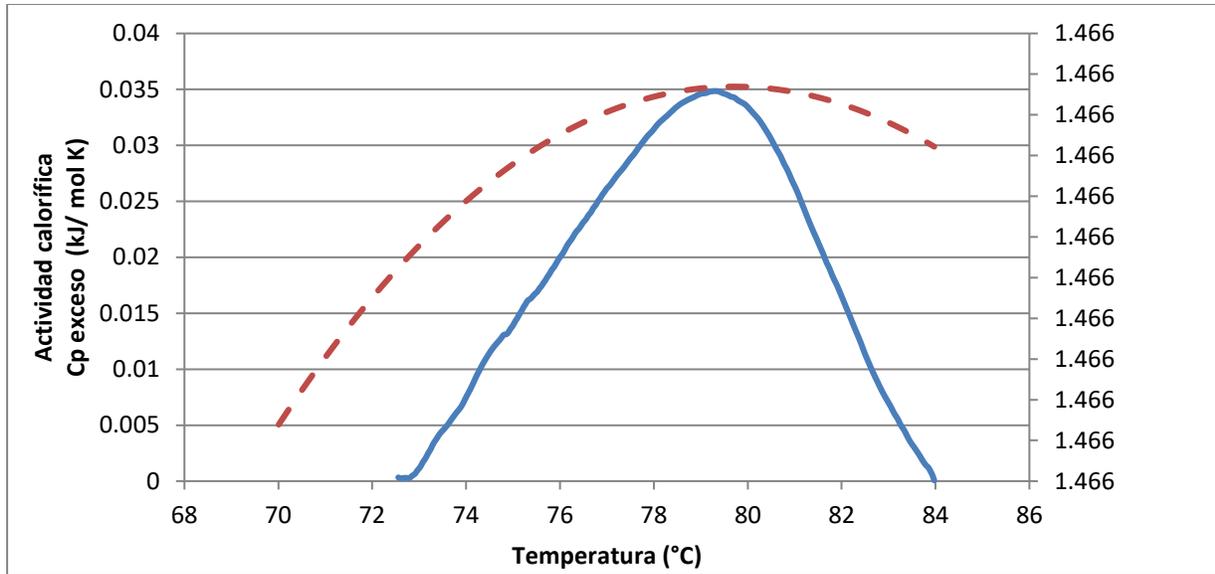


Figura 22. Variación con la temperatura de la capacidad calorífica de la endoproteasa tratada a 400 MPa para una concentración de 5 g/100 mL en buffer de fosfatos, pH 7.5, a una tasa de 1.2 °C/min. Línea punteada: transición predicha por la ecuación C6 (Anexo C).

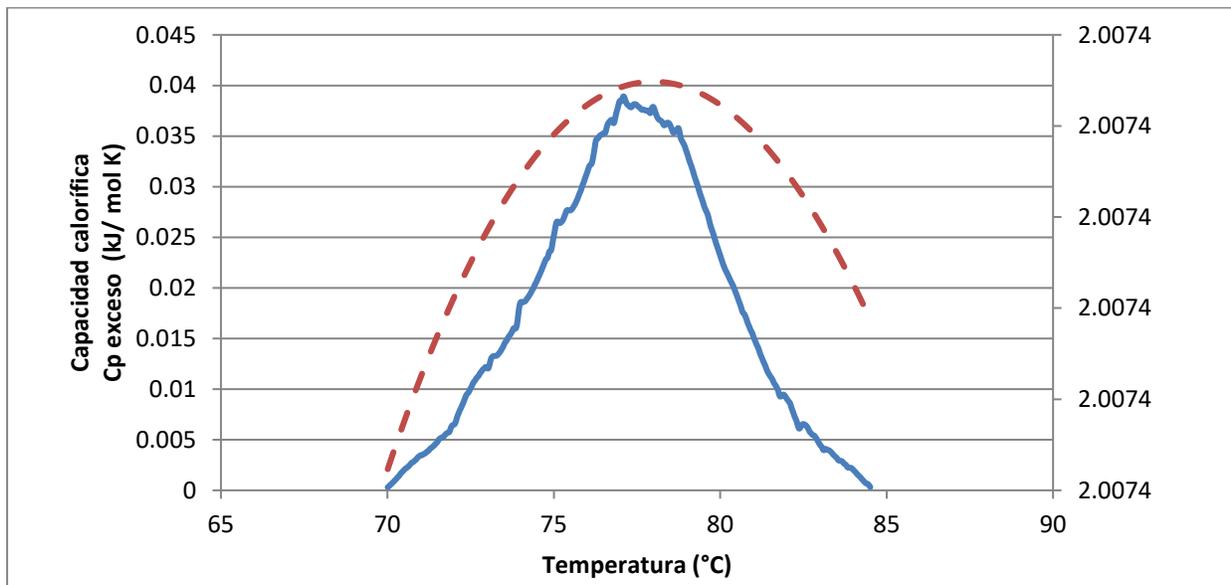


Figura 23. Variación con la temperatura de la capacidad calorífica de la endoproteasa tratada a 600 MPa para una concentración de 5 g/100 mL en buffer de fosfatos, pH 7.5, a una tasa de 1.2 °C/min. Línea punteada: transición predicha por la ecuación C6 (Anexo C).

Es posible que la presión en ambas enzimas haya provocado mayores interacciones proteína-proteína o que las moléculas de agua del buffer hayan entrado a nivel

intermolecular haciendo interacciones con los aminoácidos de la enzima, teniendo moléculas más estructuradas, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas que requieren de una mayor cantidad de energía para obtener transiciones en el calorímetro y es por lo que existe un aumento de ΔG , al igual que ΔC_p (Cuadro 7).

La endoproteasa prácticamente mantuvo su T_m en cada tratamiento, lo que indica que la enzima se mantuvo estable a pesar de los posibles ligeros cambios en su estructura.

El análisis estadístico para la endoproteasa mostró que hay diferencia significativa entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95% (Anexo B), Es clara la disminución en la actividad enzimática a 600 MPa pues afectó considerablemente el rendimiento de la actividad de ambas enzimas hidrolasas.

Cuadro 7. Propiedades termodinámicas de la endoproteasa tratada por APH y la endoproteasa sin tratamiento (control), obtenidas a partir de los termogramas de DSC (Anexo C).

Muestra	ΔH	ΔC_p	T_m	Temperatura inicial (Onset)		T_m		Temperatura final (Offset)	
				ΔG	ΔS	ΔG	ΔS	ΔG	ΔS
Control	0.0587	-4.48E-07	77	9.31E-04	1.68E-04	0.0	1.68E-04	-6.92E-04	1.68E-04
400	0.208	-3.39E-06	80	4.01E-03	5.88E-04	0.0	5.88E-04	-1.23E-03	5.88E-04
600	0.203	-1.31E-05	78	4.61E-03	5.78E-04	0.0	5.78E-04	-3.76E-03	5.77E-04

$\Delta H = \text{kJ/mol}$, $\Delta S = \text{kJ/mol}\cdot\text{K}$; $\Delta G = \text{kJ/mol}$; $\Delta C_p = \text{kJ/mol}\cdot\text{K}$. $T_m = ^\circ\text{C}$

CAPITULO V

CONCLUSIONES

En esta investigación se observaron los efectos de APH en dos enzimas hidrolasas que se tomaron como modelo.

- La endoinulinasa tuvo una disminución de 20 y 40% en la actividad enzimática a condiciones de 400 MPa y 600 MPa por 5 min respectivamente
- La endoproteasa presentó un descenso de 10 y 30 % de la actividad enzimática también a condiciones de 400 MPa y 600 MPa ambas por 5 min.

Los dos estudios muestran estadísticamente que los cambios que sufren ambas enzimas son significativos en los dos tratamientos, sin embargo, la actividad enzimática en el tratamiento de 400 MPa por 5 min se mantiene por arriba de 80 % en ambas enzimas hidrolasas. Por lo que la hipótesis se cumple para este tratamiento.

Por otro lado, la endoinulinasa y la endoproteasa se vieron más afectadas por el tratamiento de 600 MPa por 5 min pues, aunque no perdieron por completo la actividad enzimática esta sí disminuyó a 60 y 70% respectivamente. La hipótesis se cumple ya que las enzimas no se inactivan a dicha presión, aunque si disminuyó significativamente.

Los resultados de este estudio pueden servir como base para investigaciones posteriores en las cuales se examinen diferentes tiempos de exposición, dado que en la industria alimentaria el intervalo va de 5 hasta 40 min a presiones entre 100 y 800 MPa. Con ello puede disponerse de un espectro más amplio de condiciones de tratamiento por APH y su efecto sobre la actividad enzimática de estas enzimas.

Perspectivas

- Agregar factores como matriz alimentaria y empaque para observar si las interacciones entre enzima-alimento-tratamiento de APH mantienen activas a las enzimas hidrolasas.
- Aplicar diferentes condiciones de APH variando el tiempo y la presión, tomando en cuenta las condiciones aplicadas en la industria de alimentos, para encontrar las condiciones que afecten en menor proporción a estas enzimas.
- Identificar los cambios de estructura de las enzimas mediante técnicas como dicroísmo circular para confirmar las señales obtenidas por DSC.
- Realizar barridos a diferentes tasas de velocidad de calentamiento en DSC para poder determinar el modelo de desnaturalización que siguen las enzimas.

Referencias

- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2011). Purification and substrate specificities of a fructanase from *Kluyveromyces marxianus* isolated from the fermentation process of Mezcal. *Bioresource Technology*, 102(3), 3298-3303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.071>
- Bolufer, P. (2012, mayo 28). *Las altas presiones*. Interempresas. <https://www.interempresas.net/Alimentaria/Articulos/80511-Las-altas-presiones.html>
- Calvo M. (2004). *Caseínas*. <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/proteins/caseina.html>
- Capellas Puig, M. (1998). *APLICACIÓN DE LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA EN MATÓ (QUESO FRESCO DE LECHE DE CABRA)*. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5713/TMCP1de3.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Castellanos, L., Murillo, K., Ortega, D., Velasquez Orozco, I., & Ramírez-Navas, J. (2016). Empleo de inulina en matrices alimentarias. *La Alimentación Latinoamericana*, 325, 62-68.
- Chakraborty, S., Kaushik, N., Rao, P. S., & Mishra, H. N. (2014). High-Pressure Inactivation of Enzymes: A Review on Its Recent Applications on Fruit Purees and Juices: HPP of enzymes in fruit purees & juices.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 578-596. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12071>
- Chen, H.-Q., Chen, X.-M., Li, Y., Wang, J., Jin, Z.-Y., Xu, X.-M., Zhao, J.-W., Chen, T.-X., & Xie, Z.-J. (2009). Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. *Food Chemistry*, 115(4), 1206-1212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.067>
- Corona González, R, Pelayo Ortiz, C, González Álvarez, V, & Zuñiga Partida, V. (2005). *OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INULINASAS POR SACCHAROMYCES SP. A PARTIR DE AGAVE TEQUILANA WEBER VARIEDAD AZUL*. <https://www.redalyc.org/pdf/730/73000308.pdf>
- Curbelo, Y. G., López, M. G., Bocourt, R., & Rodríguez, Z. (2012). Los prebióticos en la alimentación de animales monogástricos. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 46(3), 7.

- Dhillon, A., Sharma, K., Rajulapati, V., & Goyal, A. (2016). *Proteolytic Enzymes* (pp. 149-173).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00007-5>
- Domínguez-Ramírez, L. L. (2015). Presión hidrostática ultra alta, usos y perspectivas en las ciencias biológicas y de la salud. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 16(2), Article 2.
<http://www.revistas.unam.mx/index.php/vertientes/article/view/51705>
- Elamin, W. M., Endan, J. B., Yosuf, Y. A., Shamsudin, R., & Ahmedov, A. (2015). High Pressure Processing Technology and Equipment Evolution: A Review. *Journal of Engineering Science and Technology Review*, 10.
- Fellows, P. J. (2009). *Food Processing Technology | ScienceDirect*.
<https://www.sciencedirect.com/book/9781845692162/food-processing-technology>
- Fujinaga, M., Cherney, M. M., Oyama, H., Oda, K., & James, M. N. G. (2004). The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3364-3369.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0400246101>
- García-Cano, I., Rocha-Mendoza, D., Ortega-Anaya, J., Wang, K., Kosmerl, E., & Jiménez-Flores, R. (2019). Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(13), 5243-5257.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09844-6>
- Hartley, B. S. (1960). PROTEOLYTIC ENZYMES. *Annual Review of Biochemistry*, 29(1), 45-72.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.29.070160.000401>
- HIPERBARIC, S.A. (2020). *HPP - Proceso de conservación de alimentos por alta presión*. Procesado por Altas Presiones para Alimentos y Bebidas. <https://www.hiperbaric.com/es/hpp>

- Jermann, C., Koutchma, T., Margas, E., Leadley, C., & Ros-Polski, V. (2015). Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.06.007>
- Jiang, L., Wu, Q., Xu, Q., Zhu, L., & Huang, H. (2017). Fermentative hydrogen production from Jerusalem artichoke by *Clostridium tyrobutyricum* expressing exo-inulinase gene. *Scientific Reports*, *7*(1), 7940. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07207-7>
- Laskar, A., & Chatterjee, A. (2009). Protease – Revisiting the Types and Potential. *Online Journal of Biotechnology Research (OJBR)*, *1*(1), 55-61.
- Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *57*(4), 387-396.
- Neklyudov, A., Ivankin, A., & Berdutina, A. (2012). *Production and purification of protein hydrolysates (Review)* (Vol. 36). <https://doi.org/10.1007/BF02738038>
- Oxen, P., & Knorr, D. (1993). Baroprotective Effects of High Solute Concentrations Against Inactivation of *Rhodotorula rubra*. *LWT - Food Science and Technology*, *26*(3), 220-223.
<https://doi.org/10.1006/fstl.1993.1048>
- Peña, C., & Quirasco, M. (2014). ¿Enzimas en los alimentos? Bioquímica de lo comestible. *Revista Digital Universitaria (UNAM)*, *15*.
- Perezan, R. (2015). *Modelos simples para estudiar el efecto de la presión en el plegamiento de las proteínas* [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid].
<https://eprints.ucm.es/28025/1/T35591.pdf>
- Pradas Baena, I., & Moreno Rojas, J. (2016). *Aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas en la Industria Alimentaria*. <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/registro-servifapa/e73772df-c03a-4e56-84a8-a8ce3143a8b2/download>

- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597-635. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98927/>
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., & Barrett, A. J. (2006). MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue), D270-272. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj089>
- Robertson, A. D., & Murphy, K. P. (1997). Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. *Chemical Reviews*, 97(5), 1251-1268. <https://doi.org/10.1021/cr960383c>
- Rodríguez Alegría, M, C. R., E. (2013). *Enzimas aplicadas en procesos industriales*. <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art96/>
- Rodriguez, L. (2018). *Caracterización de un sistema enzimático para la producción de fructooligosacáridos*. UNAM, FQ.
- Sara Juan Ovejero, P. (2015). *Aplicación de altas presiones hidrostáticas y enzimas proteolíticas en mostos para mejorar la estabilidad proteica de los vinos blancos*. 26. <https://core.ac.uk/download/pdf/61550448.pdf>
- Suriñach, S., Baro, M. D., Bordas, S., Clavaguera, N., & Clavaguera-Mora, M. T. (1992). La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 31(1), 11-17. <http://boletines.secv.es/upload/199231011.pdf>
- Taurai, M. (2007). *Purification, Characterisation and Application of Inulinase and Transferase Enzymes in the Production of Fructose and Oligosaccharides* [Rhodes University]. <https://core.ac.uk/download/pdf/145051992.pdf>
- Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., Pérez-Lamela, C., Vázquez, M., & Simal-Gándara, J. (2001). APLICACIÓN DE LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA EN LA CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS APPLICATION OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE IN THE FOOD PRESERVATION APLICACIÓN DA ALTA PRESIÓN

- HIDROSTÁTICA NA CONSERVACIÓN DOS ALIMENTOS. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(2), 66-80. <https://doi.org/10.1080/11358120109487649>
- Torabizadeh, H., Habibi-Rezaei, M., Safari, M., Moosavi-Movahedi, A. A., Sharifzadeh, A., Azizian, H., & Amanlou, M. (2011). Endo-inulinase stabilization by pyridoxal phosphate modification: A kinetics, thermodynamics, and simulation approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(7-8), 1661-1673. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9385-x>
- Trapala, J. (2017). *Obtención y caracterización de inulinasas a partir de Kluyveromyces sp. En la hidrólisis de agavina / 2017*. UNAM, FQ.
- Velazquez, G., Vázquez, P., Vázquez, M., & Torres, J. (2005). Aplicaciones del procesado de alimentos por alta presión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(5), 343-352. <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/11358120509487661?needAccess=true>
- Vigueras-Morales, Y. S. (2019). Enzimas proteolíticas: Generalidades y la importancia de las aspartil proteasas fúngicas. En Á. Marroquín-De Jesús, *CIERMMI Mujeres en la ciencia T.4* (1.ª ed., pp. 1-15). ECORFAN. <https://doi.org/10.35429/H.2019.4.1.15>
- Webb, E. C. (1989). Enzyme Nomenclature. Recommendations 1984. *European Journal of Biochemistry*, 179(3), 489-533. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14579.x>
- Wong González, E. (2010). ¿Después de un análisis de variancia?qué? Ejemplos en ciencia de alimentos. *Agronomía Mesoamericana*, 21(2), 349. <https://doi.org/10.15517/am.v21i2.4899>

ANEXO A

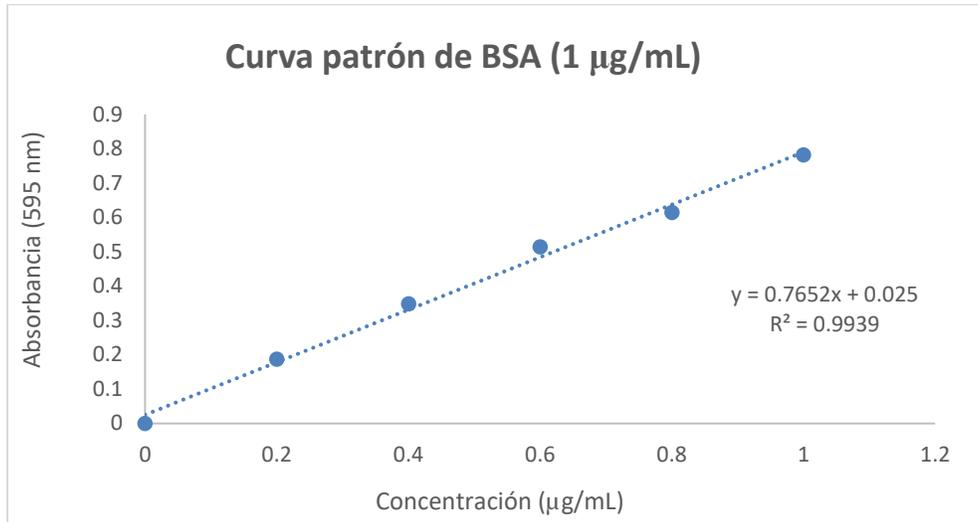


Figura A.1. Curva patrón de BSA para determinar proteína por el método de Bradford.

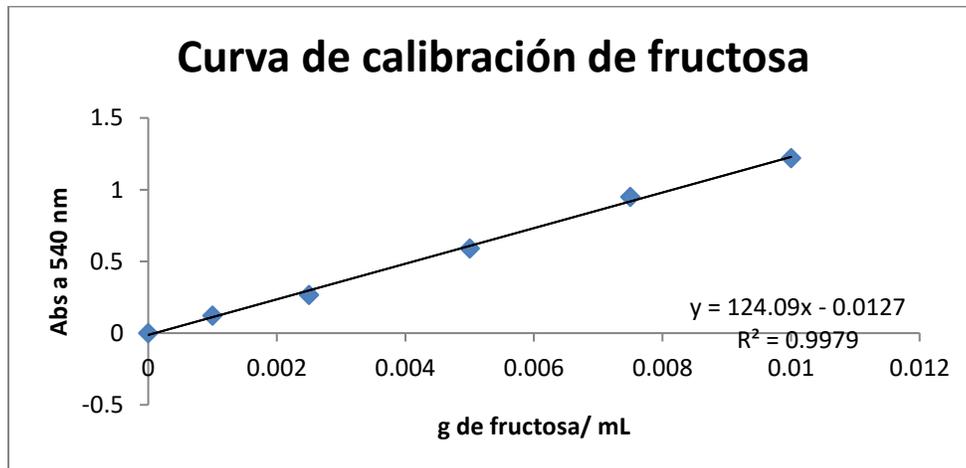


Figura A.2. Curva de calibración de fructosa a partir de una disolución de fructosa 1 g/ 100 mL para la determinación de azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959).

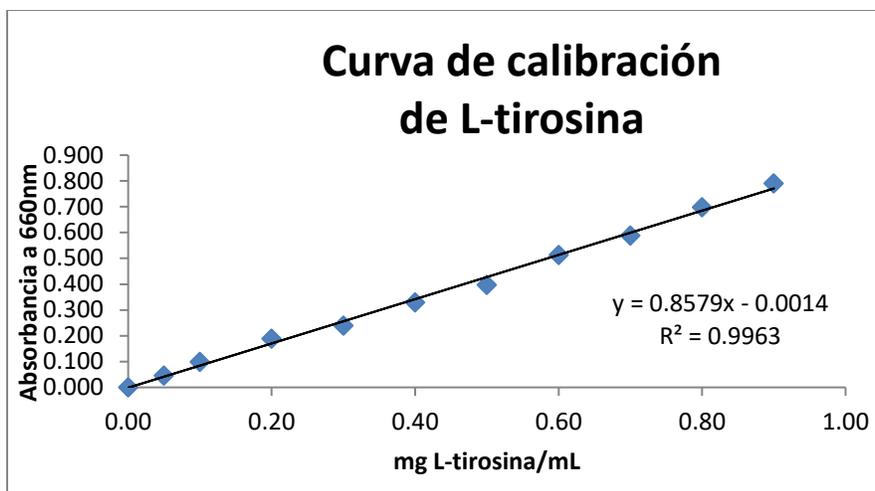


Figura A.3. Curva de calibración a partir de una disolución de L-tirosina 0.2 mg/mL para la determinación de actividad enzimática de endoproteasa (Sigma Aldrich, 2008)

ANEXO B

Análisis de varianza de un factor para los tratamientos de APH para Endoinulina RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	9.22	3.07	0.00264
Columna 2	3	7.34	2.44	0.00216
Columna 3	3	5.66	1.89	0.00718

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.11	2	1.05	263.8	1.42E-06	5.14
Dentro de los grupos	0.024	6	0.004			
Total	2.13	8				

Valor prueba F	Valor P	SI/NO
236.8 > Valor crítico para F	1.42-06 < 0.05	Si existe diferencia significativa

PRUEBA DE TUKEY

HSD=	0.158
Multiplicador=	4.34
MSe=	0.004
n=	3

	Control	400 Mpa	600 Mpa
Control		0.627	1.185
400			0.559
600			
		Mayor a HSD	

PRUEBA DE DUNNETT

HSD=	0.121
Multiplicador=	2.34
MSe=	0.004
n=	3

	400 Mpa	600 Mpa
Control	0.627	1.185
	Mayor a HSD	

Análisis de varianza de un factor para los tratamientos de APH para Endoproteasa
RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3.0	12.4	4.1	0.0
Columna 2	3.0	11.2	3.7	0.0
Columna 3	3.0	8.5	2.8	0.0

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.63	2.00	1.32	236.4	1.97E-06	5.14
Dentro de los grupos	0.03	6.00	0.01			
Total	2.67	8.00				

Valor prueba F	Valor P	SI/NO
236.4 > Valor crítico para F	1.97-06 < 0.05	Si existe diferencia significativa

PRUEBA DE TUKEY

HSD= 0.187
 Multiplicador= 4.34
 MSe= 0.006
 n= 3

	Control	400 Mpa	600 Mpa
Control		0.415	1.30
400			0.882
600			
			Mayor a HSD

PRUEBA DE DUNNETT

HSD= 0.174
 Multiplicador= 2.86
 MSe= 0.006
 n= 3

	400 Mpa	600 Mpa
Control	0.415	1.30
		Mayor a HSD

ANEXO C

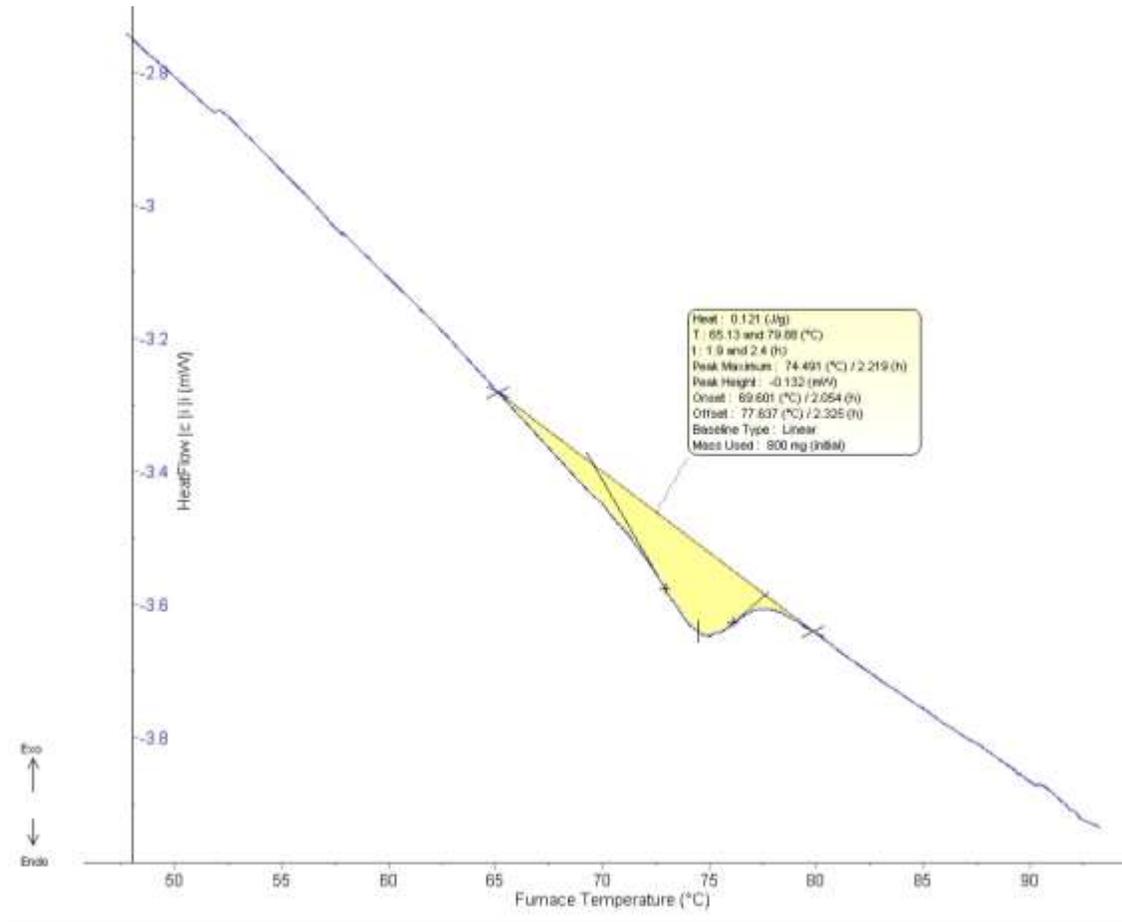


Figura C.1. Termograma de flujo de calor vs temperatura obtenidos por DSC

La ecuación de Gibbs-Helmholtz

$$\Delta G(T) = \Delta H(T) - T\Delta S(T) \quad (C1)$$

se usa para analizar la desnaturalización de proteínas globulares. En ella las propiedades de estado $\Delta G(T)$, $\Delta H(T)$ y $\Delta S(T)$ están en función de la temperatura definidas por el cambio de la capacidad calorífica a presión constante. Bajo estas condiciones la ecuación (C1) se expresa como

$$\Delta G(T) = \Delta H_{(T_m)} + \Delta C_p(T - T_m) - T \left[\frac{\Delta H_{(T_m)}}{T_m} + \Delta C_p \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] \quad (C2)$$

Al reacomodar los términos en la ecuación (C2) se obtiene

$$\Delta G(T) = \Delta H_{(T_m)} \left(\frac{T_m - T}{T_m} \right) + \Delta C_p(T - T_m) - T\Delta C_p \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \quad (C3)$$

Y de la ecuación (C2) se deduce que

$$\Delta H(T) = \Delta H_{(T_m)} + \Delta C_p(T - T_m) \quad (C4)$$

$$\Delta S(T) = \frac{\Delta H_{(T_m)}}{T_m} + \Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_m}\right) \quad (C5)$$

Con los valores de T_m , $\Delta H_{(T_m)}$ y ΔC_p que se determinan experimentalmente se calcularon $\Delta G_{(T)}$, $\Delta H_{(T)}$ y $\Delta S_{(T)}$

Ejemplo de cálculo:

Para endoinulinaasa (control)

$$T_m = 74.49 \text{ }^\circ\text{C} (347.64 \text{ K})$$

$$\Delta H_{(T_m)} = 0.1297 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta C_p = 0.001331 \text{ kJ/mol}\cdot\text{K}$$

$$T_{\text{onset}} = 69.60 \text{ }^\circ\text{C} (342.75 \text{ K}) \text{ (Fig. C.1.)}$$

$$\Delta G(T) = \Delta H_{(T_m)} \left(\frac{T_m - T}{T_m}\right) + \Delta C_p(T - T_m) - T\Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)$$

$$\Delta G(T) = \left[0.1297 \left(\frac{347.64 - 342.75}{347.64}\right)\right] + [0.001331 (342.75 - 347.64)] - [(342.75)(0.001331)\ln\left(\frac{342.75}{347.64}\right)]$$

$$\Delta G_{(T)} = [0.001824] + [-0.006508] - [-0.006462] = 0.001778 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

$$\Delta S(T) = \frac{\Delta H_{(T_m)}}{T_m} + \Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)$$

$$\Delta S(T) = \frac{0.1297}{347.64} + (0.001331)\ln\left(\frac{342.75}{347.64}\right)$$

$$\Delta S(T) = 0.0003739 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{K}} - 0.00001885 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{K}} = -0.003550 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{K}}$$

El análisis teórico de la desnaturalización de las enzimas se determinó con uno de los modelos Lumry-Eyring (Fig. C.2.) considerado el modelo más sencillo que pasa de un estado nativo a uno completamente desnaturalizado y es reversible.



Figura C. 2. Modelo de desnaturalización irreversible en dos pasos: despliegue (D) reversible de la proteína nativa (N).

La ecuación correspondiente a un despliegue reversible de dos estados es (Sanchez-Ruiz, 1992)

$$Cp^{exceso} = \frac{\Delta H^2}{RT^2} \frac{K}{(K+1)^2} \quad (C6)$$

Donde K es la constante de equilibrio entre N y D, dada por

$$K = \frac{[D]}{[N]} = \exp \left\{ -\frac{\Delta H_{T_m}}{R} \left[\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right] \right\} \quad (C7)$$

Ejemplo de cálculo:

Para endoinulinasa (control)

$$\Delta H(T_m) = 0.1297 \text{ kJ/mol}$$

$$T_m = 74.49 \text{ }^\circ\text{C} \text{ (347.64 K)}$$

$$T_{onset} = 69.60^\circ\text{C} \text{ (342.75 K)} \text{ (Fig. C.1.)}$$

R es la constante de gases ideales = 0.008314 kJ/K · mol

$$K = \exp \left\{ -\frac{0.1297}{0.008314} \left[\frac{1}{342.75} - \frac{1}{347.64} \right] \right\} = 0.9998 \quad (C8)$$

$$Cp^{exceso} = \frac{(0.1297)^2}{0.008314(342.75)^2} \frac{0.9998}{(0.9998+1)^2} = 0.000004306 \text{ kJ/ K}\cdot\text{mol} \quad (C9)$$