

2 grafs. d. d. t.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA "BERZELIUS"



**APLICACION DE LAS ENZIMAS
PANCREATICAS A LA PELETERIA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO

PRESENTA

Bernardo López Petterson

1951





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**A las enzimas proteolíticas,
con mi admiración.**

**A mis padres, cariñosamente.
A mi familia.**

A mis maestros.

S U M A R I O:

Capítulo 1.

Generalidades y estudio de las enzimas; de la tripsina en particular.

Capítulo 2.

Generalidades sobre curtiduría; rendido en particular. Obtención de preparados pancreáticos activos.

Capítulo 3.

Medición de la actividad de las enzimas en los rendidores.

Capítulo 4.

Discusiones.

Conclusiones.

Bibliografía.



APLICACION DE LAS ENZIMAS PANCREATICAS A LA PELETERIA.

CAPITULO PRIMERO.

Estudio histórico y definiciones de enzima.

El concepto de enzima está íntimamente ligado con el de fermentación. Varios tipos de fermentaciones son conocidas al hombre desde tiempo inmemorial así, la alcohólica, cuyo empleo en la fabricación de vinos, alcoholes, pulques, etc., partiendo de trigo, maíz, uva, arroz, maguey, etc., es antiquísimo; también desde hace mucho tiempo son conocidas las fermentaciones acética y láctica.

Se consideraba en términos generales, como fermentación, todo proceso (muy variable) en que hubiera desprendimiento de gases. Precisamente su nombre lo adquirió de esta propiedad (del latín —fermentare— hervir) siendo Pasteur el que lo aplicó para designar las reacciones microbiológicas, en las que por descomposición del substrato los gases resultantes semejan a la ebullición.

Gay Lussac empleó el término fermentación, aplicándolo al desdoblamiento de los azúcares en alcoholes y bióxido de carbono. Ante-

riormente Kirchoff, en 1814, descubrió la acción catalítica de los componentes amiláceos de la harina de trigo en la fermentación del almidón, para producir azúcar y dextrina. Liebig y Whoe-ler, en 1837, notaron la escisión de la amigdali-na, por la acción de la emulsina extraída de las almendras amargas. En esta misma época Cor-visart, describe la tripsina, y Schwann la pepsina que producen la hidrólisis de las proteínas por un proceso no fermentativo, esto es, sin desprendimiento de gases. Así por primera vez, el concepto de enzima se extiende a sustancias —pepsina y tripsina— que no producen fermentación.

Liebig ideó una teoría de la descomposición, considerando que el proceso de fermentación es una alteración del equilibrio molecular del substrato, seguida de una desintegración química del mismo fermento. Esta definición se consideró la mejor durante una época, hasta que Pasteur notó que la actividad de ciertos organismos simples, descubiertos por él, estaban íntimamente ligados con la fermentación. Pensó que los procesos fermentativos sólo podían llevarse a cabo en presencia de células vivas, comprobando su teoría, demostrando que la fermentación alcohólica sólo se efectuaba en presencia de levaduras vivas. Posteriormente, se encontró que la presencia de las células vivas no es indispensable en la fermentación, y que ciertas sustancias de carácter complejo y provenientes del metabolismo de estos microorganismos pueden llevar a cabo la fermentación, sin la intervención de alguna forma vital. Estos productos preformados por células vivas pueden actuar como fermentos, y se les denominó enzimas o enzimos (del griego —Zyme— levadura), por haberse notado su presencia primero en estos hongos.

La definición de fermentación más clara y amplia es aquella que nos indica que se trata de un proceso Físico-Químico-Biológico, en el transcurso del cual se efectúan cambios químicos en un substrato (proteínas, carbohidratos, esterés, etc.) por la acción de las enzimas, que se consideran como catalizadores bioquímicos producidos por determinados microorganismos. En la actualidad se han identificado los conceptos de fermento y enzima, habiendo el progreso de la química revelado en gran número de ellos en la naturaleza.

Para una comprensión más clara de las enzimas, se les puede considerar como catalizadores definidos de naturaleza orgánica, con un poder específico de reacción, y originados en células vivas, independientemente de la presencia de éstas en la operación.

Los catalizadores de naturaleza orgánica, productos del metabolismo microbiano, desarrollan una gran actividad. Como ejemplo, podemos considerar la lactosa, la cual puede ser hidrolizada lentamente por el HCl 2.0 N; al provocar la misma hidrólisis por la enzima lactasa, se nota que ésta se lleva a cabo con una velocidad 200 veces mayor.

Aunque muchas de las reacciones catalizadas por microorganismos, o productos de ellos, se consideren indeseables, V gr., ciertas fermentaciones en vinaterías, y algunas putrefacciones, hay otras que revisten una gran importancia industrial, siendo una de ellas el objeto del presente estudio.

En su gran mayoría, estos fermentos producen una acción degradante sobre el substrato. Hay otros muchos que poseen una extraordinaria capacidad de síntesis; así, la acción de un de-

terminado tipo de levaduras sobre productos celulósicos baratos, produce grasas.

Debido posiblemente a que las funciones metabólicas de una célula son variadas (crecimiento, digestión, reproducción, etc.), ésta es capaz de producir una gran variedad de enzimas.

Para nombrar las enzimas, se adiciona el sufijo ASA a la raíz del nombre del substrato sobre el que actúa.

Las enzimas se dividen en dos grupos, según su acción sobre el substrato; los que ejercen una acción hidrolítica (en su mayoría), se denominan hidrolasas, y aquellas que intervienen en reacciones de óxido reducción, desmolasas. Las enzimas con respecto a su posición en la célula, pueden dividirse en exoenzimas o enzimas extracelulares y en endo-enzimas o enzimas intracelulares.

Las enzimas extracelulares se forman en el interior de la célula y son expulsadas al exterior posteriormente; generalmente, la célula los emplea en su alimentación, ya que la hidrólisis que producen en algunas proteínas e hidratos de carbono hacen a estos asimilables a la célula, porque los productos de la hidrólisis pueden ser difundidos a través de la membrana celular. Este tipo de enzimas —las exoenzimas—, se pueden poner de manifiesto filtrando un cultivo de microorganismos que los produzcan, a través de una bujía o filtro adecuado que retenga todas las células y haciendo actuar el filtrado sobre un substrato adecuado en el que debe producirse la acción enzimática.

Las endoenzimas permanecen en el interior de la célula y son usadas por ella para su alimentación y respiración. Estas actúan sobre los productos difundidos a través de las membranas; se puede demostrar su presencia por medio de la siguiente prueba, que efectuó Buchner, por

primera vez; se toma un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual se lava perfectamente bien, se seca y tritura con arena de cuarzo esterilizada, haciendo después una extracción con alcohol y acetona con lo que se obtiene un jugo de levadura capaz de fermentar una solución azucarada como si tratara de levaduras vivas; en cambio efectuando solo una filtración, sin trituración no hay ningún cambio en el substrato, lo cual indica que la enzima capaz de efectuarlo se encuentra localizada en el interior de la célula.

La mayor parte del conocimiento que se tiene de las enzimas ha sido logrado en las enzimas extra-celulares, las cuales son muy fáciles de obtener.

Constitución de las enzimas.

Las enzimas son compuestos de naturaleza proteica muy compleja, cuya estructura exacta todavía no se ha logrado determinar. En 1922, Fodor sostenía que las enzimas no sólo se deben considerar como compuestos químicos de una estructura peculiar, sino como constituyentes directos del protoplasma, teniendo además un grado especial de dispersión coloidal.

Esta última es una condición esencial; la enzima debe encontrarse en estado coloidal y al perderse éste por cualquier causa (floculación, etc.) se pierden las propiedades enzimáticas.

El efecto de las enzimas no es alterado por algunas acciones físicas; así, es posible adsorberlas sobre sustancias orgánicas e inorgánicas, siempre que éstas sean inertes y no afecten la actividad normal de la enzima; esta propiedad se aprovecha principalmente para adsorberlas en materiales inertes que se pueden considerar

como "portadores" de la enzima, que permiten una aplicación industrial más cómoda. En el caso de las enzimas pancreáticas (tripsina, amilasa, lipasa) empleadas en el rendido de las pieles, se acostumbra emplear el serrín de madera finamente dividido, como materia de carga o relleno. Las enzimas tienen una capacidad de reacción específica siempre que actúen en un grado determinado de dispersión coloidal. Estas reacciones son más bien características de un grupo definido de sustancias químicas, que de constituyentes específicos del protoplasma.

De lo anterior se deduce que la actividad enzimática depende tanto de la constitución química (capacidad de reaccionar específicamente con un grupo de sustancias) como de la forma física en que se encuentran (diversos grados de dispersión coloidal).

Así R. Willstätter considera que las enzimas están formadas de un portador coloidal y de un grupo de naturaleza química activa y específica, el cual les permite ligarse al sustrato.

Factores que influyen en la actividad enzimática.

Hay un cierto número de factores que tienen influencia en la actividad enzimática, cuyo conocimiento es conveniente, a fin de lograr un mayor rendimiento en las reacciones en que intervienen las enzimas como catalizadores. Los más importantes son: el efecto de la temperatura, la concentración de iones hidrógeno o pH, la concentración de la enzima y del sustrato en el sistema, la acción de ciertas sustancias que actúan como activadores o inhibidores en la reacción. De menor importancia es la acción de la luz ultravioleta.

Efecto de la Temperatura.

Las enzimas al igual que las células vivas tienen temperaturas características de acción máxima, mínima y óptima

En términos generales se puede decir que a un aumento de temperatura corresponde un aumento en la actividad enzimática hasta llegar a un punto en que esa actividad es la máxima, correspondiendo esta temperatura a la óptima que es característica de cada enzima. Si se sigue elevando ésta va decreciendo la velocidad de reacción, hasta llegar a un límite pasado el cual la enzima se inactiva, ya no actúa. Una baja excesiva de la temperatura también ocasiona la inhibición de la enzima, aunque es más soportable que la elevación de la misma

Dentro de ciertos límites, la velocidad de una reacción se duplica o triplica al incrementar en 10 grados C. su temperatura.— La relación que existe entre la velocidad de una reacción enzimática efectuada a dos temperaturas que difieren entre sí en 10 grados C., se llama "Coeficiente térmico".

Generalmente, se puede considerar que a temperaturas superiores a 50 grados centígrados las enzimas en solución son inactivadas rápidamente y que esta inactivación es mayor al aumentar la temperatura siendo completa al llegar a los 80 grados C.— Sin embargo hay un determinado grupo de enzimas que resisten temperaturas más elevadas, como por ejemplo la papaina, bromelina, la renina, etc.— En algunos casos la inactivación debida a la temperatura es reversible como sucede con la tripsina, pero esto está influenciado por varios factores como son las concentraciones de la enzima y del substrato, así como por la duración del experimento.



También está influenciado por el tipo de calor al que están sometidas: el calor húmedo las destruye rápidamente, en cambio, preparaciones de enzimas perfectamente secas pueden resistir temperaturas de 100 a 120 grados centígrados.

Relación entre la velocidad de reacción y la temperatura:

En 1889, Arrhenius encontró que en las soluciones se encuentran dos tipos de moléculas: activas unas, e inactivas las otras, y en un equilibrio tautómero y determinó la relación empírica entre la velocidad de reacción y la temperatura a la que ésta se efectúa:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{A}{T^2}$$

En la que la derivada del logaritmo natural de la constante de velocidad de una reacción química con respecto a la temperatura es inversamente proporcional al cuadrado de la temperatura absoluta

La misma relación se ha deducido teóricamente, en los últimos años de la cinética de las reacciones.— La temperatura produce cambios físicos en la materia como serían las diferentes velocidades de difusión, de densidades, de viscosidades, etc.— Así se ha llegado a la siguiente ecuación:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E}{RT^2}$$

En la que: K es la constante de velocidad de la reacción que se aplica en la ley de acción de masas para determinar el equilibrio; T la tem-

peratura absoluta; R la constante de los gases; y E la energía de activación de las moléculas.

Integrando la ecuación anterior queda:

$$\log k = \frac{E}{2.303 R} \left(\frac{1}{T} + C \right)$$

$$\log k = \frac{E}{2.303 R} \left(\frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \right)$$

La energía de activación puede ser obtenida mediante datos experimentales.— La constante de integración se puede considerar como una temperatura $C = \frac{1}{T_1}$ la cual se necesita determinar.

El mismo Arrhenius encontró que la relación empírica anterior puede ser empleada en ciertas reacciones catalizadas por enzimas.— La forma de la ecuación usada en las reacciones biológicas es la siguiente:

$$\log k = \frac{U}{2.303 R} \left(\frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \right)$$

El valor de U se puede obtener de datos experimentales considerándolo como el incremento crítico de la temperatura, la temperatura característica, o la temperatura de velocidad constante.— Se usa U en lugar de E para indicar que no es necesario introducir un valor físico complicado como sería la energía de activación.

Crozier en 1924 analizó el valor de U para numerosas formas de reacciones biológicas, encontrando resultados que varían de 8,000 a 18,000 calorías.— A temperaturas habituales se puede considerar el valor de U como de 12,000 cal. con bastante aproximación, y de 16,800 para temperaturas más elevadas.

Efecto de la concentración de iones hidrógeno o pH.

Experimentalmente se ha observado que las gráficas que relacionan la actividad de una enzima con el pH (manteniendo como constantes todos los demás factores que afectan dicha actividad), son curvas de segundo grado (con un solo punto de inflexión), con un máximo determinado. El punto donde se localiza este máximo corresponde al pH óptimo de la reacción.

Efecto de la luz ultravioleta.

En términos generales se puede decir que la luz ultravioleta tiene influencia sobre las enzimas, activando o acelerando la reacción.— Pero por ser las enzimas sustancias de naturaleza muy compleja, dosis altas de la misma luz ultravioleta pueden descomponerlas en sustancias más simples e inactivas.— Por consiguiente, no es aconsejable someter las reacciones enzimáticas a su acción.

Influencia de la concentración de sustrato.

Las reacciones enzimáticas están regidas por la Ley de acción de masas de Guldberg y Waage, sólo que la constante K de esta reacción depende de varios factores que se modifican en el transcurso de la misma reacción, impidiendo la aplicación cómoda de esta ley.

Se puede considerar que dentro de ciertos límites es conveniente aumentar la concentración del sustrato en la mezcla, límites que, es necesario obtener directamente por experiencias prácticas

Concentración de la enzima.

Es otro de los factores que influyen en las reacciones enzimáticas.— Las enzimas se han considerado esencialmente como catalizadores y por la misma definición de catalizador tendremos que alterarán la velocidad de una reacción sin que ellas adquieran una modificación permanente.—

Para que un cuerpo se considere como catalizador debe reunir además las características siguientes:

- a).—Una pequeña cantidad de ellos hacen reaccionar grandes cantidades de otros cuerpos.
- b).—Al final de la reacción se encuentran en el mismo estado que en la iniciación.
- c).—La velocidad de reacción es proporcional a la cantidad de catalizador pero sólo dentro de ciertos límites.
- d).—Hacen variar la velocidad de las reacciones generalmente acelerándola (hay catalizadores negativos que retrasan la reacción).

Considerando el inciso (c), que es consecuencia de la misma definición se comprende que es posible aumentar la velocidad de reacción aumentando la concentración de la enzima hasta cierto límite (específico según cada caso particular), que pasado el cual es inútil todo aumento de su concentración en el sistema.

Como catalizadores (a), se debía usar sólo una parte infinitesimal de ellas, pero debido a la acción de otras sustancias que actúan como venenos transformándolos en otros cuerpos químicamente diferentes, con la pérdida de sus propiedades catalíticas, y de algunas modificaciones físicas que también pueden sufrir, es necesario

añadirlos en mayor cantidad a la teóricamente necesaria.

Teoría de Michaelis-Menton

En 1913, al estudiar la acción de la invertasa sobre la sacarosa encontraron que la velocidad inicial de hidrólisis de ésta a diferentes concentraciones es proporcional a la concentración de un compuesto intermedio sacarosa—invertasa que se forma.

Dieron la siguiente relación empírica:

$$\frac{A}{B} = \frac{S}{S + K_s}$$

En la que:

A representa la invertasa combinada; B la invertasa total; S la concentración de la sacarosa libre y K_s la constante de disociación del compuesto intermedio formado.

Graficando estas ecuaciones obtenemos curvas teóricas basadas en la ley de acción de masas.— Esta experiencia es satisfactoria para concentraciones de sacarosa inferiores al 1.5%.

Las gráficas que nos dan la relación entre la actividad y el logaritmo negativo de la concentración del substrato se denominan curvas de actividad o curvas pS.— Este concepto puede ser aplicado con bastante exactitud para todas las enzimas.

Posteriormente, Nelson y Larson usando fosfatos y citratos y una serie de soluciones de sacarosa con diferentes pH comprobaron que había una cierta armonía entre las curvas pS obtenidas prácticamente y las encontradas teóricamente.— Explicaron que las desviaciones de los valores prácticos obtenidos a altas concentraciones

nes de sacarosa se deben principalmente a la disminución de la concentración del agua en la solución.— Como comprobación variaron las concentraciones relativas de la sacarosa y el agua por adición de diferentes cantidades de alcohol absoluto encontrando que su explicación era correcta.

Ultimamente Stern demostró por espectroscopia la formación del compuesto intermedio, el cual tiene las propiedades del compuesto enzima-substrato supuesto por Michaelis—Menton.

Activadores e inhibidores.

Las sustancias que aumentan la actividad de las enzimas al ponerlas en contacto con ellas, se llaman activadores.— Estas sustancias son específicas para cada enzima.— Así por ejemplo el HCl activa la pepsina, el NaCl, la amilasa y las sales de amonio, la tripsina.

Los inhibidores, llamados también tóxicos o venenos son sustancias también específicas que disminuyen la actividad enzimática o la hacen cesar por completo.— Entre estos tenemos, las sales de los metales pesados, ciertos compuestos orgánicos (alcaloides), el ácido cianhídrico, el monóxido de carbono y algunos agentes oxidantes o reductores.— Hay también determinadas sustancias que actúan como inhibidores para un grupo de enzimas, sirviendo de activadores para otras.— La concentración en que se encuentran estas sustancias tiene también una acción decisiva: por ejemplo, el HCl que en bajas concentraciones (menos de 1%) activa la pepsina, al ser añadido en mayor cantidad (del 1 al 2%) ya inhibe su acción, pudiendo llegar a destruir la enzima si se añade en cantidades que sobrepasen esta concentración.

Antisépticos.

Las enzimas están sujetas a la acción destructiva de los microorganismos.— Para preservarlas se emplean los antisépticos, substancias que en concentraciones relativamente bajas evitan la presencia de organismos inferiores por interferir sus funciones reproductivas.— Se cuenta con un gran número de antisépticos, entre los que podemos considerar: el toluol, cloroformo, fluoruro de sodio, timol, formaldehído, etc.

La elección de éste debe ser cuidadosa, ya que hay algunos que actúan como inhibidores, pudiendo llegar a destruir la enzima que se desea preservar.

Para la mayor parte de los casos el toluol es usable, ya que su separación es fácil, mediante filtración de la solución que contiene la enzima.— Tiene sin embargo el inconveniente de destruir las soluciones diluidas de pepsina y tripsina, e inhibir la acción de la esterasa libre por lo que no siempre es posible su empleo.

Expresión de la actividad de las enzimas.

Este método es independiente de la concentración de las enzimas en las soluciones, ya que el cambio producido por la enzima es sólo proporcional a la concentración que tenga ésta en la primera parte de la reacción.— La potencia de una enzima se mide en unidades que expresan la cantidad de cambio que sufre el substrato, el cual se mantiene en condiciones perfectamente definidas.

Para medir la pureza de una preparación enzimática se considera el número de unidades que con su acción produzca, tomando como base un gramo de enzima seca.

Clasificación y localización de las enzimas más importantes.

Grupo	Enzima	Localización.
Esterasas	Fitolipasa	Aceites de semillas.
	Esterasa animal	Libre.
	Lipasa	Páncreas y Estó- (mago)
	Tanasa	Aspergillus Niger.
	Fosfatasa	Levadura
	Sulfatasa	Aspergillus Oryzae
	Clorofilasa	Hojas verdes.
Próteasas	Pepsina	Estómago
	Tripsina	Páncreas
	Erepsina	Páncreas, intestino, leva- (dura.
	Papaína	Arbol de papaya (Carica (—papaya).
Amino-Acilasas	Ureasa	Frijol de soya
	Histozima	Riñón
	Arginasa	Libre.
Carbohidrasas	Amilasa	Pitalina, Páncreas
	Sacarasa	Malta, levadura
	Maltasa (1)	Levadura
	Lactasa	Levadura
	Nucleasa	Intestino.
Enzimas de Oxidación	Peroxidasa	Raíces, embriones
	Tirosinasa	Patata
	Uricasa	Libre.
Catálidas	Catálida	Levadura y libre.

Enzimas de fermentación	} Complejo de	la zimasa	Levadura
		Carboxilasa	Levadura
		Carboligasa	Levadura

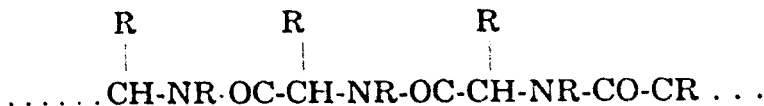
(1) Se divide en α y β glucosidasas.

Las próteasas o enzimas proteolíticas de las cuales trata en particular este trabajo se dividen en proteinasas y peptidasas.— Las primeras desdoblán las proteínas verdaderas transformándolas a polipéptidos los cuales son hidrolizados por las segundas dando mezclas de aminoácidos.

Las proteasas pancreáticas.

La inteligencia de la acción de las proteasas, implica una noción así sea sumaria, de la estructura del substrato sobre el que actúan, la molécula protéica.

Las proteínas están constituidas por el enlace de pequeñas unidades, los aminoácidos, que se integran en una compleja estructura.— Este enlace se realiza, principalmente, por la unión del carboxilo de un aminoácido con el grupo α amínico de otro, en la siguiente forma:

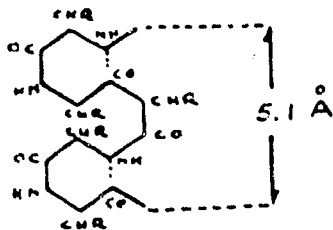


por la ligadura peptídica, clave de bóveda del edificio protéico.

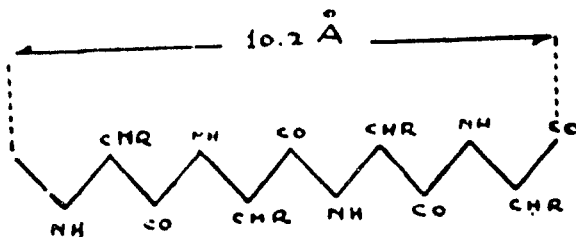
Una proteína pues, puede considerarse como una larga cadena polipeptídica ocompuesta de diversos aminoácidos enlazados por la ligadura peptídica.— Además de la diferencia que hay de una proteína a otra por su distinta composición

de aminoácidos, existen diferencias resultantes del mayor o menor plegamiento de la cadena polipeptídica sobre sí misma por fuerzas de valencia secundarias

El análisis con la cámara de difracción de rayos X permitió a Astbury diferenciar dos tipos físicoquímicos fundamentales de proteína, el globular:



y el fibroso:



en los que el distinto acomodo espacial de la cadena polipeptídica origina propiedades diversas.

Las enzimas proteolíticas escinden la ligadura peptídica, con la consiguiente fragmentación de la molécula proteica en polipéptidos cada vez más pequeños hasta quedar reducidos a los aminoácidos constituyentes libres.

La síntesis de Bergmann del benzoil—oxi—carbonilo, permitió a éste preparar distintos tipos de polipéptidos, con los que pudo analizar el mecanismo de acción de las diversas proteasas.

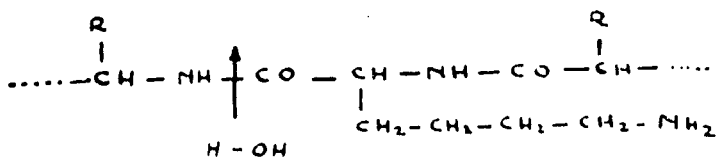
Así distinguió tres grandes grupos de proteasas: las exopeptidasas, que escinden ligaduras

peptídicas terminales, las endopeptidasas, que hidrolizan las ligaduras peptídicas centrales—interiores— de la molécula proteica, y las dipeptidasas que también dividen el puente peptídico, sólo que lo hacen únicamente sobre pequeñas moléculas de dipéptidos.

El páncreas posee diversas proteasas, las que interesan particularmente al presente estudio.— La digestión pancreática de las proteínas se realiza por la acción conjunta de tres enzimas: la tripsina, la quimotripsina, y la carboxipeptidasa.

La tripsina no es secretada al estado activo, sino en estado de pre—fermento, el tripsinógeno, que es activado por otra enzima la enteroquinasa. Una vez activada la tripsina activa más tripsinógeno, por lo que el papel de la enteroquinasa es sólo iniciar dicha conversión del tripsinógeno a tripsina. Tanto el tripsinógeno como la tripsina han sido obtenidos por Northrop y Kunitz en estado cristalino.

La tripsina es una endopeptidasa que requiere, según Bergmann, para su acción, la presencia de un grupo, —amínico libre de lisina en la inmediata vecindad del enlace peptídico que hidroliza:

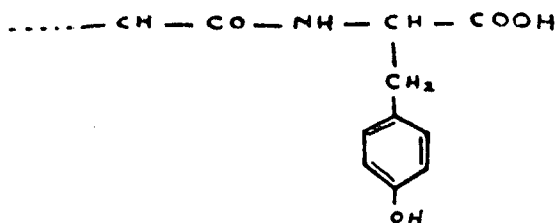


Posee un pH óptimo de acción de 8 a 9, variable según el sustrato. Es una proteína por lo que es destruída por la pepsina en solución ácida. En soluciones de pH 2, es bastante estable, así como en estado seco.

La quimotripsina es también secretada inactiva, como quimotripsinógeno que es activado

por la tripsina.— Es una endopeptidasa de acción en todo similar a la de la tripsina.— Su diferenciación de ésta se realizó hasta que se obtuvo en forma cristalina.

La carboxipeptidasa es una exopeptidasa que ha sido aislada en estado cristalino por Aucon.— Actúa sobre el enlace peptídico inmediatamente cercano a un carboxilo libre, necesitando, además, la presencia del grupo fenólico de la tirosina, en la vecindad del mismo enlace peptídico, para poder actuar.

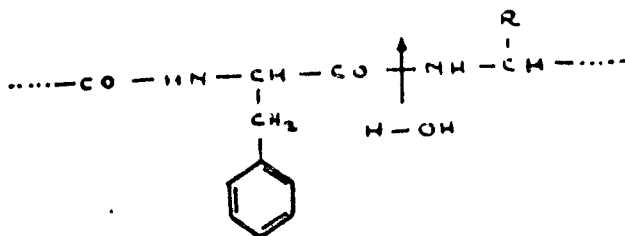


7. Tiene un pH óptimo de acción alrededor de

Tanto el tripsinógeno como el quimotripsinógeno, se activan espontáneamente aún en ausencia de enteroquinasa, con el tiempo.— Una suspensión de páncreas, macerado y homogenizado, muestra si se deja en reposo varias horas, actividad trípica

Además de las proteasas descritas, que están presentes en los productos de secreción del páncreas, el jugo pancreático, las suspensiones de páncreas macerado y los extractos secos del mismo contienen otras dos: la catepsina I y la catepsina II, las que yacen en las células hasta quedar liberadas por maceración.— La primera de acción similar a la de la pepsina, hidroliza las proteínas intactas, actuando sobre los enlaces peptí-

dicos centrales que tienen en su vecindad la cadena lateral de la fenilalanina:



La segunda, a semejanza de la tripsina, cuyos requerimientos estructurales de sustrato comparte, actúa sobre productos secundarios de la hidrólisis proteica —protaminas e histonas— pobre en fenil—alanina, sobre las cuales ya no tiene acción la catepsina I.

Las suspensiones de páncreas macerado, así como los extractos secos, poseen, pues, un poderoso mecanismo enzimático proteolítico, capaz de degradar la molécula proteica intacta —por la acción de la catepsina I— hasta protaminas e histonas, las que por ulterior acción de la tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y capticina II, son hidrolizadas hasta sencillos polipéptidos. Es este mecanismo enzimático, justamente el que tiene tanto interés en el uso de los extractos pancreáticos en el “rendido” del cuero para liberarlo de elastina y proteínas análogas que son indeseables por la rigidez y otras propiedades desagradables que le comunican.

Efecto de la concentración del sustrato en la hidrólisis triptica.

Se determina usando como sustratos, gelatina, caseína y hemoglobina, los que son tratados a 35 grados C. con tripsina cruda y cristalizada.—

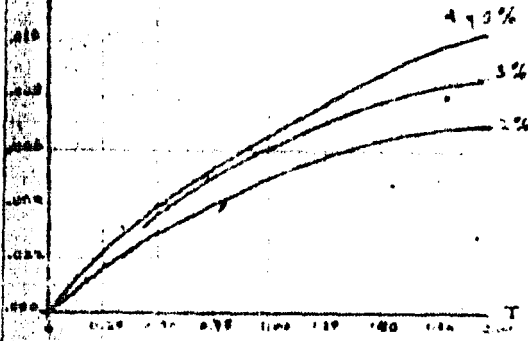
La digestión se determina por la cantidad de substrato hidrolizado.

Se emplean, en cada caso, dos soluciones enzimáticas a diferentes concentraciones, a 2.5% en una y 5% en la otra, notándose que cuando se lleva efectuada la tercera parte de la reacción, la cantidad de substrato digerido por la tripsina cruda es más o menos la misma para las dos concentraciones, variando la proporción según avanza la reacción — Además, se observa que la cantidad de substrato digerido no es proporcional a su concentración, permaneciendo independiente a ella.— Posiblemente esto se deba a la formación del compuesto intermedio enzima-substrato.— Esta anomalía se observa mucho menos marcada cuando se trata de tripsina cristalina, dependiendo el resultado más de la concentración del substrato en la mezcla que de la concentración de la enzima, y apegándose, por consiguiente, más a la ley de acción de masas.

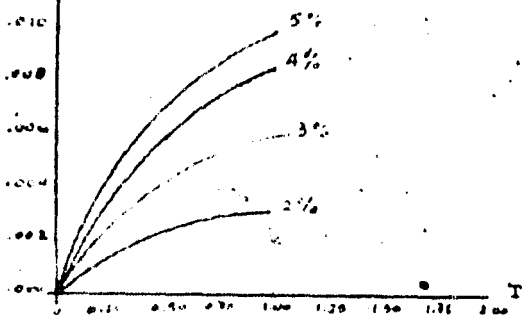
Curvas típicas de hidrólisis pueden observarse en la gráficas adjuntas:

TRIPSINA LIQUIDA

M. U. CONN. M. G. G.

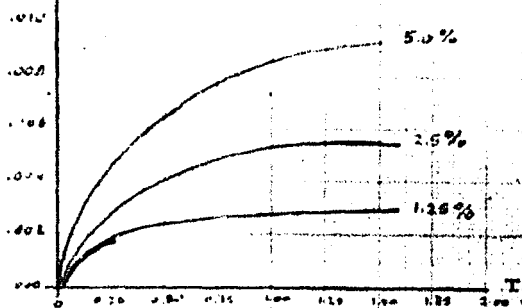
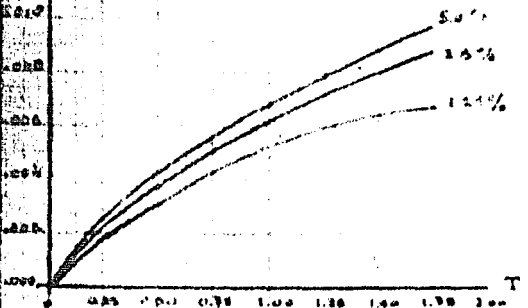


TRIPSINA CRISTALINA



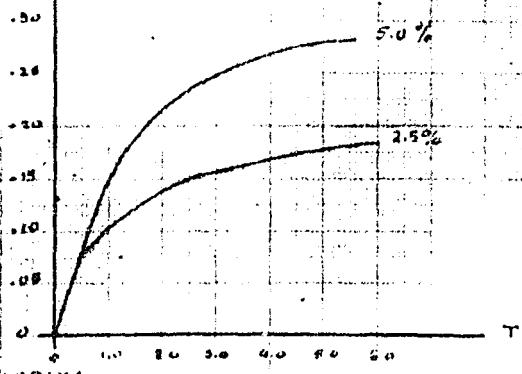
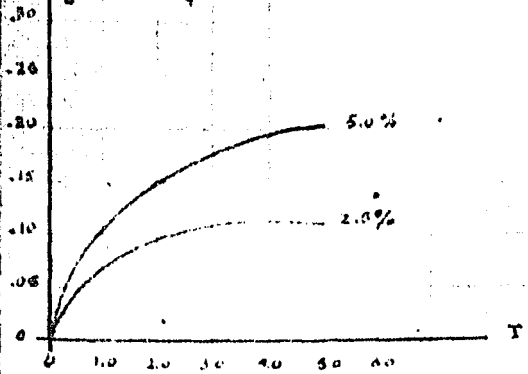
GELATINA TITULADA CON FORMOL

M. U. CONN. M. G. G.



CABEINA TITULADA CON FORMOL

M. U. N. DISTRICTO DE C. O.



HEMOGLOBINA

Medida de la acción de la tripsina.

Esta medida es arbitraria y sólo permite establecer comparación entre dos muestras distintas. Está basada, según Northrop, en la licuefacción que sufre la gelatina, y, según Willstätter y Persiel, en el incremento de acidez que sufre la solución durante la hidrólisis de la gelatina alcohólica.

En la técnica de Willstätter - Persiel el mismo aumento de acidez puede provocar la inhibición cuando menos parcial de la hidrólisis, además de ser necesario el empleo de una pequenísimas parte de la enzima en comparación con la cantidad del sustrato por hidrolizar.

Con esta misma teoría la unidad de tripsina U. T. se define por la relación entre la cantidad de enzima añadida y la cantidad de sustrato hidrolizado. Esta unidad varía con el sustrato empleado: la U. T. basada en la hidrólisis de la caseína determina la cantidad de la enzima que efectúa dicha hidrólisis, siguiendo el aumento de acidez del sustrato y equivale a 1.05 c. c. de KOH 0.2N., efectuando la prueba bajo condiciones definidas. Esta unidad tiene más o menos el mismo valor que la obtenida cuando se usa gelatina como sustrato.

Se acostumbra efectuar estas determinaciones usando caseína como sustrato, por permitir ésta una determinación más correcta, ya que es completamente selectiva, atacándola sólo el compuesto tripsina-enteroquinasa y nunca por la tripsina libre

Sumario de las principales características y propiedades de la tripsina, quimotripsina y quimotripsinógeno.

- 1.—Quimotripsinógeno.
- 2.—Quimotripsina.
- 3.—Tripsina.

El coeficiente térmico de la tripsina fué encontrado por Rayliss, quien lo determinó usando como substrato caseína, y tomando las temperaturas entre 20 y 30 grados centígrados.

		$\frac{K_t - 1}{K_t} \cdot 10$	5.3	
Forma cristalina		1	2	3
		Prismas alargados	Rombos	Prismas cortos
Análisis Elemental	C	50.6	50.0	50.0
	H	7.0	7.06	7.1
	N	15.8	15.5	15.0
	Cl	0.17	0.16	2.85
	S	1.9	1.85	1.1
	P	0.0	0.0	0.0
	Cenizas	0.1	0.12	1.0
Nitrógeno amínico dado como pr % del N total				
10.- Por formol		4.7	6.0	9.3
2.- Por el método de Van Slyke		4.75	6.0	6
Solubilidad en agua destilada		poca	muy soluble	muy soluble

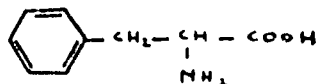
Volumen molecular obtenido por el coeficiente de difusión en c.c. mol	52,000	52,000	52,000
Peso molecular obtenido por medio de la presión osmótica	36,000	41,000	36,500
pH óptimo en la digestión de la caseína	—	8 a 9	8 a 9
Punto isoelectrico por cataforesis de partículas de colodión	5.0	5.4	7 a 8
Color	incoloro	incoloro	incoloro
Hidratación aparente en gr. de agua/gr. de proteína			0.54
Radio de la partícula			2.6 milimicras.

Acción de las enzimas sobre el substrato (en especial la Tripsina).

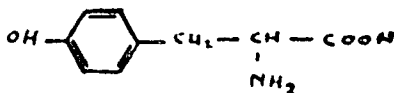
La especificidad de acción de las enzimas está determinada por la capacidad de reacción que éstas tienen para determinados substratos. Considerando las principales proteasas (pepsina, quimotripsina y tripsina), encontramos que las dos primeras pueden distinguirse de la tripsina por medio de una análisis de los aminoácidos que resulten de la hidrólisis del substrato.

Así en los residuos del ataque de un subs-

trato por la pepsina y la quimotripsina se encuentran siempre: fenil-alanina

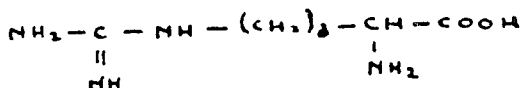


y la tripsina,

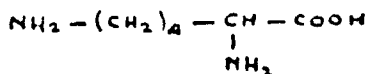


dos aminoácidos de carácter neutro.

En cambio, en los residuos de substratos hidrolizados por tripsina, cualesquiera que sean éstos, se encuentran siempre la arginina:

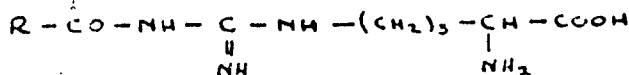


y la lisina:

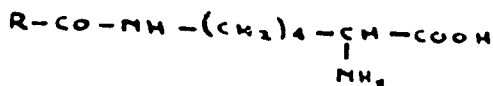


aminoácidos en los que por predominar los grupos amino tienen un carácter básico. De aquí se deduce que las proteasas atacan siempre la proteína que forma el substrato en el enlace peptídico que une al aminoácido típico (aislado y reconocido en cada caso por análisis) con el resto de la molécula.

La tripsina atacará aquellos substratos que tengan la siguiente composición:



y



reaccionando con los carboxilos finales en los residuos de lisina y arginina.

El polipéptido o proteína puede permanecer insensible a la acción de las proteasas si un grupo amínico y un grupo carboxílico aparecen libres cerca del enlace peptídico.

También pueden sufrir modificaciones en su actividad por los cambios que puedan producirse en el resto de la estructura que no abarca el aminoácido típico, como sería la variación en los residuos de los aminoácidos no típicos.

La explicación del pH óptimo a que trabaja cada enzima está relacionado con el sustrato, y es aquel punto en que la concentración de los iones hidrógeno presentes en la reacción producen la máxima ionización del sustrato en los puntos o enlaces que separan el aminoácido típico de cada hidrólisis del resto de la molécula.

CAPITULO SEGUNDO.

Generalidades sobre la Curtiduría, y sobre Rendido en particular.

Para una mayor comprensión de la serie de operaciones unitarias que constituyen la curtiduría, vamos a considerar primeramente la constitución química de la piel o cuero, que constituye la materia prima principal en esta industria.

Se conocen una gran variedad de tipos de pieles, ya sea que éstas pertenezcan a peces, reptiles o mamíferos: sólo consideraremos estas últimas, por tener las otras volúmenes relativos de consumo muy limitados.

Su piel está formada por un conjunto de células de muy diferentes características, y sirviendo a estos animales como un medio de defensa o protección para los órganos interiores más delicados, para disminuir la acción de los cambios de temperatura sobre los mismos, como un amortiguador de golpes, etc.

Histológicamente se le considera formado por células nerviosas, de secreción y excreción, glándulas, conductos, músculos y vasos sanguíneos.

La consideración química del cuero nos proporciona mayor utilidad por el conocimiento de las mismas sustancias que lo forman y que

afectan su curtido.— La mayor parte de la materia sólida que lo constituye, está formado de prote.nas.

Las proteínas (del griego: Proteios —primario—) derivan su nombre de la importancia que tienen como constituyentes de la materia viva.— Intervienen siempre en su composición C, H, N, y O, y a veces también el S, entrando el fósforo sólo en contadas ocasiones.— No es fácil diferenciarlas entre sí por medio de análisis elementales, pues su composición centesimal varía entre límites muy estrechos.— Para su separación se aprovechan las diferentes solubilidades que poseen en disolventes específicos, y para su clasificación o determinación las diferentes velocidades de hidrólisis.— Son anfóteras: pueden combinarse con ácidos o bases según se empleen el grupo aminico o carboxílico en la reacción.— No son solubles en agua y por absorción de ésta sufren una hinchazón.— Muchas de estas se encuentran en la naturaleza conjugadas con un componente de naturaleza no proteica llamado grupo prostético.

Las proteínas se encuentran sujetas a un proceso llamado desnaturalización que disminuye, siempre su solubilidad y que consiste en la alteración de sus propiedades, siendo ésta la máxima dificultad que se tiene para su estudio.— Esta desnaturalización se lleva a cabo por la acción de los ácidos, álcalis, calor, diversas sustancias químicas, luz ultravioleta, etc.

No tienen puntos de fusión ni de descomposición característicos, y, en ocasiones, lo que se forma al efectuar su disolución es una suspensión coloidal.— Su hidrólisis se efectúa en pasos, produciéndose proteasas, peptonas, polipéptidos y aminoácidos, o sea que el compuesto formado

en esta hidrólisis va en orden decreciente de complejidad.

Las proteínas se pueden considerar como la unión de aminoácidos para dar polipéptidos, que a su vez se condensan con un aminoácido, un polipéptido o con un grupo prostético para dar la proteína.— Entre los productos de hidrólisis del cuero ha sido posible aislar 18 distintos aminoácidos, lo cual da una idea de la gran cantidad de combinaciones posibles para dar proteínas, sin embargo, hay un grupo que predomina.— Las más importantes desde el punto de vista de la curtiduría, son las siguientes, colocadas en orden decreciente a su importancia: Mucina, albúmina, melanina, queratina, elastina, las llamadas proteínas de superficie granular (sin nombre específico) y el colágeno.

Mucina.

Es una proteína conjugada, del grupo de las glicoproteínas.— Contiene en su molécula además del grupo proteínico, un carbohidrato.

Es insoluble en agua y algo soluble en soluciones alcalinas, de las que se precipita por adición de ácidos — Es bastante abundante en el cuero de los mamíferos (sobre el 2.7% del total de las proteínas).— Se cree que la mucina forma parte de las sustancias que se encuentran como cementos interfibrilares, pero su presencia en éstos, así como la del colágeno no ha sido completamente explicada.

Se encuentra asociada con sustancias mucoides, y se distingue y separa de éstas aprovechando sus diferentes solubilidades y propiedades de precipitación.

en esta hidrólisis va en orden decreciente de complejidad.

Las proteínas se pueden considerar como la unión de aminoácidos para dar polipéptidos, que a su vez se condensan con un aminoácido, un polipéptido o con un grupo prostético para dar la proteína.— Entre los productos de hidrólisis del cuero ha sido posible aislar 18 distintos aminoácidos, lo cual da una idea de la gran cantidad de combinaciones posibles para dar proteínas, sin embargo, hay un grupo que predomina.— Las más importantes desde el punto de vista de la curtiduría, son las siguientes, colocadas en orden decreciente a su importancia: Mucina, albúmina, melanina, queratina, elastina, las llamadas proteínas de superficie granular (sin nombre específico) y el colágeno.

Mucina.

Es una proteína conjugada, del grupo de las glicoproteínas.— Contiene en su molécula además del grupo proteínico, un carbohidrato.

Es insoluble en agua y algo soluble en soluciones alcalinas, de las que se precipita por adición de ácidos — Es bastante abundante en el cuero de los mamíferos (sobre el 2.7% del total de las proteínas).— Se cree que la mucina forma parte de las sustancias que se encuentran como cementos interfibrilares, pero su presencia en éstos, así como la del colágeno no ha sido completamente explicada.

Se encuentra asociada con sustancias mucoides, y se distingue y separa de éstas aprovechando sus diferentes solubilidades y propiedades de precipitación.

Albúmina y Globulina.

Se encuentran en la linfa del cuero, en la sangre, y a veces, en los músculos y nervios.— Es neutra la albúmina y ácida la globulina, difíciles de salificar, y están caracterizadas por la ausencia de glicina entre los productos de su hidrólisis.— Rosenthal las extrajo del cuero de perro, con una solución de NaCl en tolueno a 37° C., coagulándolas con agua, alcohol y éter.— Al pesarlas notó que correspondían al 24% de las proteínas totales; sin embargo, al repetir la experiencia con cuero de ternera sólo obtuvo el 4.2%, lo que quiere decir que las características del cuero dadas por su composición varían de una especie a otra de animales.

Las albúminas son solubles en agua pura o en soluciones diluidas de ácidos, bases o sales, de las que son precipitadas por la adición de ácidos minerales concentrados o por saturación con sales.— Las globulinas son insolubles en agua pura, pero se disuelven en soluciones de pH neutro, de donde se pueden precipitar por dilución o mediante la saturación con sal.— Ambas se coagulan por la acción del calor.

Melanina.

Es una proteína de color intenso, con tonos que varían generalmente de café rojizo a negro, y constituye el pigmento del tejido epitelial y del pelo.— Probablemente se deriva de la sangre y de la linfa.— Su desarrollo se aumenta poniéndola en contacto con la luz solar, obscureciéndose el tono del pigmento, funcionando fisiológicamente como un protector de la luz intensa.

Es insoluble en agua y ácidos diluidos, pero

más o menos soluble en álcalis diluidos.— Se extrae del tejido epitelial por calentamiento con soluciones alcalinas y precipitación con ácidos.— Además de los elementos fundamentales en todas las proteínas, contiene cantidades variables de Fe y S en combinación.

Queratina.

Es el principal constituyente de la epidermis, pelo y células epiteliales de las glándulas.— Difiere de las demás proteínas en el alto contenido de cistina que resulta al hidrolizarla; los aminoácidos que resultan de esta hidrólisis no están en proporción constante, sino que varían de uno a otro análisis, debiéndose esto probablemente a que se trata de una mezcla de diferentes queratinas más o menos mezcladas con otras proteínas.

El método de obtención, consiste en diluir los materiales que la contienen y hervirlos con agua, digiriendo el residuo con una solución ácida de pepsina, seguida de la acción de una solución alcalina de tripsina, las que hidrolizan las otras proteínas y tratando después la solución con agua, alcohol, y finalmente con éter, precipitándose entonces la queratina.— Es resistente a la acción de los ácidos y álcalis diluidos, a la pepsina y a la tripsina.— Para disolverla se pueden usar álcalis cáusticos o agua caliente a 150 grados C. bajo presión.

Elastina.

Se encuentra en las fibras elásticas amarillas que entrelazan las capas más exteriores de la dermis, y en las que envuelven los nervios y vasos sanguíneos, en los tendones del cuerpo, etc.— Tiene la propiedad de hacer elásticos los

tejidos en que se encuentra; a los tendones les permite aumentar hasta 150% su longitud; la elastina de los tendones tiene las mismas propiedades que la que se encuentra en el cuero, por facilidad de extracción se prefiere usar aquellos en su separación, la cual se hace mediante una solución de NaCl, lavando y calentando con agua, tratando luego con una solución acuosa de KOH al 1%, lavando nuevamente con agua y añadiendo finalmente ácido acético.- El residuo se trata en frío con una solución al 5% de HCl durante 24 horas, se hierve y lava con agua, alcohol y éter; al secarla se obtiene, poseyendo la elastina un color blanco amarillento.

No es soluble en agua ni en álcalis y ácidos en frío; pero fácilmente soluble en ácidos minerales concentrados y en caliente.

Proteínas de la superficie granular.

Este grupo de proteínas es marcadamente resistente a los reactivos químicos ordinarios.— Está formado por las proteínas que constituyen las fibras delgadas que se encuentran en la superficie del cuero; no se disuelven por la acción de los álcalis si no se encuentran éstos muy concentrados; en agua hirviendo, sufren un cambio en su composición, pero sin disolverse.— Aparentemente no son afectadas por la tripsina, aunque ésta se encuentre en una solución lo suficientemente fuerte para disolver todas las fibras de elastina que se encuentran en la dermis y epidermis.— Son fácilmente atacadas y licuadas por las bacterias que producen putrefacción; es necesario que estén en contacto con el agua, y a un pH de 6 para que se realice ésta.

Estas fibras representan sólo una pequeña

proporción en peso de las proteínas del cuero, pero tienen mucha importancia ya que afectan la forma del grano del mismo ya curtido

Colágeno.

Es la proteína más abundante en el cuero.— Tiene mucha importancia en el curtido ya que constituye el volumen casi total de las sustancias que forman las fibras blancas de los tejidos conjuntivos del derma.

El colágeno se puede obtener para su estudio del cuero fresco, removiendo y eliminando los demás constituyentes proteicos mediante tratamientos adecuados.

Calentándolo con agua a 70° C., el colágeno pasa a gelatina, incorporándose a la solución; no se conoce la relación que liga las estructuras químicas de estas sustancias.— Hofmeister supone que el colágeno es el anhídrido de la gelatina y que el paso de una estructura a otra es reversible, como el colágeno se regenera secando gelatina a 130° C., considera que en este calentamiento se elimina agua, formándose el anhídrido supuesto.

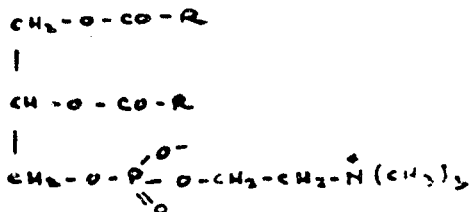
El colágeno es hidrolizado por soluciones concentradas de ácidos y álcalis, reduciéndose el tiempo de hidrólisis si ésta se efectúa en caliente.

El conocimiento de la química del colágeno y la gelatina tiene mucha importancia en la manufactura del cuero curtido.

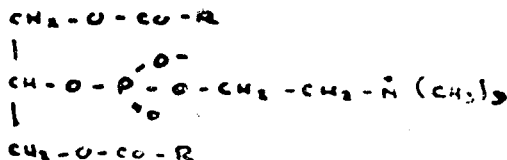
Otras sustancias:

Además de las proteínas ya consideradas, se encuentran un gran número de sustancias de naturaleza no proteica, en la sangre, linfa y secreciones glandulares del cuero.

En la sangre y en la linfa se encuentran algunos tipos de azúcares y varias sales, especialmente cloruros, sulfatos, fosfatos y carbonatos, de sodio y potasio: materia grasa, incluyendo las lecitinas, que son compuestos fosforados que se encuentran en combinación con las proteínas.

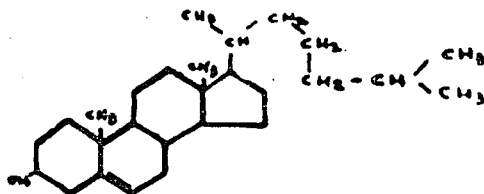


Alfa—lecitina



Beta—lecitina.

y derivados de la colessterina:



Entre las secreciones glandulares tenemos el sudor, cuyo principal componente sólido es el cloruro de sodio.

El sebo, producto de la secreción de las glándulas sebáceas, y formado por colesteroles, aceites complejos, alcoholes de alto peso molecular y jabones.

Como se puede ver la constitución química del cuero es sumamente compleja y todavía hay

una serie de puntos no suficientemente esclarecidos en su estudio.

Descripción del proceso.

El curtido, como ya se ha dicho, está formado por una serie de operaciones unitarias que constituyen el proceso tendiente a transformar los cueros crudos, de cualquier clase de animales, en un producto estable y resistente a la acción microbiana, con propiedades específicas de firmeza, flexibilidad y resistencia a la tracción, al desgaste, etc.

Hay una serie de factores que se deben tener en cuenta para llevar a cabo este proceso en las mejores condiciones y de cuyo resultado depende la calidad del producto obtenido.

Muchas de las características del cuero se encuentran determinadas por factores independientes del curtido:

La piel es un tejido que cambia con las circunstancias de vida que lleva el animal.— Si éste está sujeto a una alimentación defectuosa, o a accidentes mecánicos producidos por desgarramientos con alambradas, espinas, etc., o sujetos a las picaduras de ciertos parásitos, como pinolillos, garrapatas, etc., siempre sufrirá deterioros que influirán produciendo una baja en la calidad de la piel.— Estos factores posiblemente tengan una solución adecuada, dentro de ciertos límites, pero no intervienen directamente en la operación, por lo que nos abstendremos de profundizar en ellos.

El desuello también interviene indirectamente en el proceso.— Consiste en separar el cuero del animal del resto del cuerpo, dependiendo su calidad únicamente de la habilidad manual del operario.

una serie de puntos no suficientemente esclarecidos en su estudio.

Descripción del proceso.

El curtido, como ya se ha dicho, está formado por una serie de operaciones unitarias que constituyen el proceso tendiente a transformar los cueros crudos, de cualquier clase de animales, en un producto estable y resistente a la acción microbiana, con propiedades específicas de firmeza, flexibilidad y resistencia a la tracción, al desgaste, etc.

Hay una serie de factores que se deben tener en cuenta para llevar a cabo este proceso en las mejores condiciones y de cuyo resultado depende la calidad del producto obtenido.

Muchas de las características del cuero se encuentran determinadas por factores independientes del curtido:

La piel es un tejido que cambia con las circunstancias de vida que lleva el animal.— Si éste está sujeto a una alimentación defectuosa, o a accidentes mecánicos producidos por desgarramientos con alambradas, espinas, etc., o sujetos a las picaduras de ciertos parásitos, como pinolillos, garrapatas, etc., siempre sufrirá deterioros que influirán produciendo una baja en la calidad de la piel.— Estos factores posiblemente tengan una solución adecuada, dentro de ciertos límites, pero no intervienen directamente en la operación, por lo que nos abstendremos de profundizar en ellos.

El desuello también interviene indirectamente en el proceso.— Consiste en separar el cuero del animal del resto del cuerpo, dependiendo su calidad únicamente de la habilidad manual del operario.

Salado y Secado.

Después del desuello principian a actuar las enzimas nativas, destruyendo las proteínas del cuero, a lo que hay que añadir la putrefacción por la contaminación bacteriana.— Para poder conservar la calidad del cuero es necesario que esta putrefacción se detenga lo antes posible.— Para esto se tienen dos caminos: tratarlo con cloruro de sodio, constituyendo ésto el salado, o bien evitando la putrefacción mediante un secado completo.— Sin embargo no es posible esto último cuando se trata de pieles de animales grandes, por lo que se acostumbra usar una combinación de los dos sistemas.

La acción de la sal sobre los cueros frescos no se limita a evitar su descomposición, sino que produce una reacción con las proteínas, (no se conoce su naturaleza), mejorando así la calidad del cuero que se va a curtir.— Para conseguir el salado se acostumbra darles un tratamiento en cubas que contienen una solución concentrada de NaCl durante 48 horas, después de lo cual se secan por métodos ordinarios.— En nuestro medio no se realiza correctamente este tratamiento y el salado y secado se efectúan en los lugares donde se matan los animales, enviando los cueros posteriormente a la curtiduría donde van a recibir la serie de transformaciones indicadas para pasar de la materia prima al producto acabado.

Los cueros procedentes de los saladeros contienen cantidades bastante altas de sal y materias solubles que deben eliminarse por medio de un lavado.— En éste, se debe vigilar el pH, la temperatura, y la presencia de bacterias, así como la calidad del agua usada, la cual nunca debe contener Fe.

Remojo.

Es la primera de las operaciones unitarias.— En los cueros secos, la facilidad que tienen para absorber agua depende del procedimiento que se haya seguido para su secado.— Para mayor facilidad de absorción a veces se añaden pequeñas cantidades de NaOH, o álcalis débiles, teniendo cuidado del pH, para que no se eleve demasiado.— Cuando se trata de cueros secos se debe llevar un control cuidadoso que demuestre que han absorbido agua a su máxima capacidad, ya que de otra manera las fibras que se han pegado durante el secado no se separan lo suficiente para permitir un curtido uniforme.— El tiempo de remojo es bastante largo, por lo que es conveniente evitar la formación de bacterias en las cubas, mediante cloro o algún otro anti-séptico.

Depilado.

Hay varios métodos para lograr el depilado, el más antiguo y todavía más usado es el de la cal.— Posteriormente, se ha introducido el uso del sulfuro de sodio y del sulfhidrato.

En el método de la cal se mantiene el cuero en una solución de ésta, durante 14 días, hasta que la acción química afloja el pelo y permite desprenderlo con facilidad; este tiempo puede reducirse mediante agitación mecánica, que ayuda a una mayor difusión de la cal en la superficie de los cueros, o bien elevando la temperatura hasta unos 32 ó 35° C.— En el método del sulfuro o del sulfhidrato el tiempo de remojo en la solución donde se produce la reacción se reduce considerablemente, pero con el uso del primero hay que tener cuidado con el aumento de alcalinidad que se produce, con el

consiguiente peligro de hinchazón y endurecimiento de las pieles.— El tiempo de encalado está determinado por los diferentes tipos de cuero sobre los que va a actuar.

Una vez terminada la operación, se procede propiamente al depilado, el cual consiste en cepillar o raspar mediante una cuchilla sin filo el cuero ya encalado, con lo cual se desprende el pelo, tejido epitelial, glándulas y algunas otras sustancias indeseables en las operaciones posteriores.— Generalmente, esta operación se hace a mano, ya que las máquinas que para el efecto se encuentran en el mercado no han alcanzado un desarrollo tal que justifique su empleo.

El depilado puede efectuarse también mediante la acción de ciertas enzimas, pero su empleo todavía no está muy generalizado.— Neugenbauer sugiere el siguiente proceso enzimático para lograr el depilado: Se tratan las pieles por depilar con sulfito de sodio (aunque puede usarse cualquier sulfito alcalino), empleando simultáneamente una enzima proteolítica, (preparación comercial obtenida del *Bacillus Mesentericus*), en combinación con la sal de algún metal pesado que actúa como un activador (una parte de sulfato de cobre por 10,000 partes de solución).— Con este método se logra un ahorro considerable de tiempo, obteniéndose resultados semejantes a los conseguidos con otros métodos.

Rendido.

Anteriormente era una de las artes secretas de la curtiduría.— Originalmente, se trataba la piel con excremento de perro, que eliminaba ciertos constituyentes indeseables de la misma y le proporcionaba un grano más fino.— No se cono-

cía la interpretación química del proceso, hasta que posteriormente se encontró en el excremento de perro una serie de microorganismos que producían enzimas proteolíticas.— Con el uso de enzimas proteolíticas de otro origen se eliminó el olor desagradable que presentaban todas las tenerías que usaban el excremento para rendir, teniéndose además la ventaja de emplear productos de características más constantes, cuya acción y regulación puede controlarse.

Propiamente el rendido consiste en eliminar algunos constituyentes indeseables de los cueros, como el pelo, la epidermis y las glándulas, así como realizar la hidrólisis de las fibras de elastina y parte del colágeno.— La parte más importante es la eliminación de la elastina, cuya hidrólisis permite obtener pieles de curtido más fino.

Acción de las enzimas.

En el excremento de perro se encontraron cinco diferentes tipos de enzimas: péptica, trípica, amilolítica, renina o enzima coagulante y una lipasa.

Cuando la piel contiene abundantes células grasas, la lipasa hidroliza y emulsiona las mismas, evitando su presencia y las dificultades que en el curtido ocasiona.

La tripsina fué precipitada por Wood en 1898, partiendo de una solución acuosa de excremento de perro a la que añadió alcohol.

El uso de excrementos rendidores ha sido suplantado por una serie de preparaciones comerciales de enzimas.

La primera de éstas, se llamó, comercialmente "Erodina"— Se obtenía de cultivos de "Bacillus Erodians", los cuales se adsorbían sobre serrín de madera, adicionándoseles cloruro

de amonio en pequeñas cantidades.— Posteriormente, en 1907, Rohm usó el extracto pancreático de algunos mamíferos, al que adicionó sales de amonio (cloruro o sulfato), resultando el agente comercial llamado "Oropon".

Estas mezclas comerciales contienen varias enzimas proteolíticas, de las cuales la más importante es la tripsina, ya que según Seymour y Jones el objeto básico del rendido, consiste en la eliminación de la elastina, lo cual se logra mediante la hidrólisis que produce en ésta la tripsina.

Mediante la serie de trabajos de Rosenthal se ha comprobado que la cantidad de elastina en el cuero de ternera, después de ser tratada con tripsina baja de 10.36% a 0.31%, calculado en base seca.

La elastina debe ser eliminada de la región externa granular de la piel antes del curtido, para que aparezca un grano satisfactorio.— Es innecesaria y hasta inconveniente la hidrólisis de las capas proteínicas más interna, por lo que debe controlarse cuidadosamente.— La acción enzimática en el cuero se puede observar mediante cortes transversales en el mismo, calculando el grado de hidrólisis producido por la enzima en la proteína, y determinado experimentalmente el final de la reacción.

La degradación del cuero siempre acompaña la hidrólisis y remoción de la elastina, ya que los valores del pH a que actúa la tripsina son semejantes a aquellos valores en que se produce una degradación del cuero por lo que es importante una acción rápida de la tripsina.

Para el caso particular del rendido, la elastina digerida por un material capaz de efectuar esta digestión sólo puede ser medida por la cantidad de elastina de una determinada muestra

de cuero que es digerida o hidrolizada bajo condiciones perfectamente definidas.

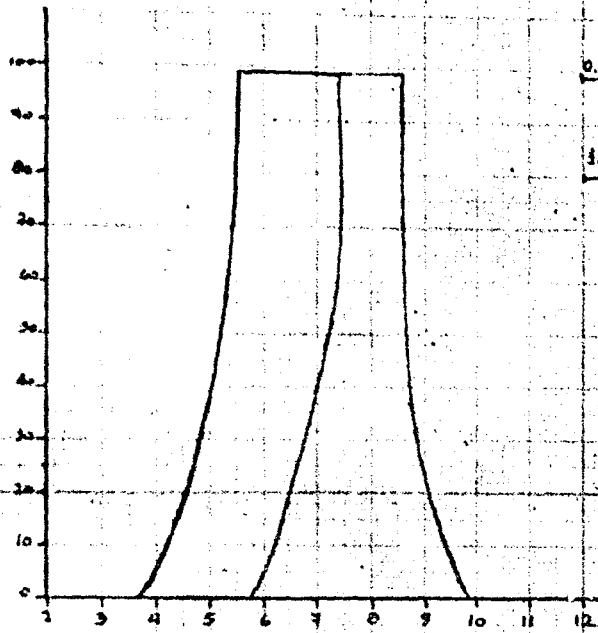
En este caso tienen influencia toda esa serie de factores considerados en el primer capítulo, como son las concentraciones, variaciones del pH, temperaturas, etc.

En la gráfica (1) se consideran los efectos del pH sobre soluciones de "Pancreatina" comercial a diferentes concentraciones.

En la gráfica (2) se observa la relación que tiene el tiempo de digestión a diferentes concentraciones de "Pancreatina", considerando en ambos casos la cantidad de elastina removida.

①

% de elastina
removida



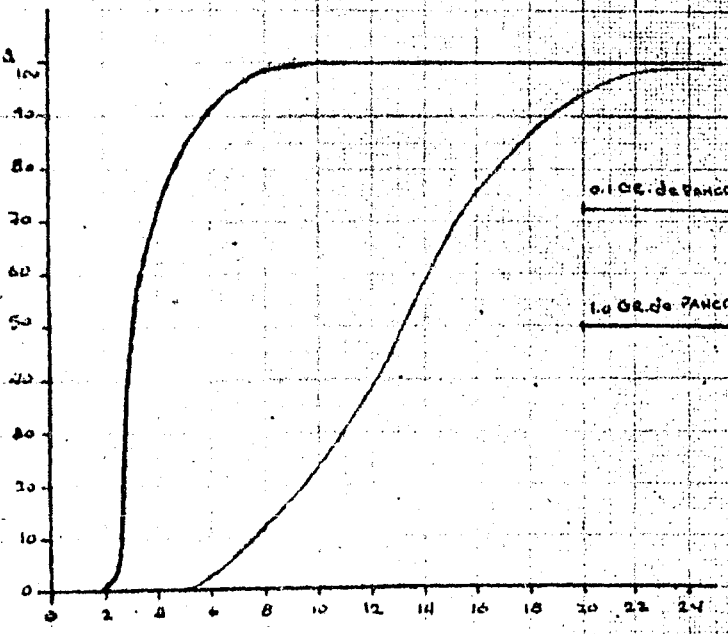
0.1 G. de PANCREATINA / LT.

1.0 G. de PANCREATINA / LT.

pH

②

% de elastina
removida



0.1 G. de PANCREATINA / LT.

1.0 G. de PANCREATINA / LT.

Time hours

A valores de la solución inferiores en su pH a 3, la elastina, no sufre ninguna acción, pero en cambio el colágeno es destruido debido a la hidrólisis ácida

El pH de la solución en que se está rindiendo el cuero debe encontrarse al pH óptimo de la enzima.— En el caso de las mezclas comerciales obtenidas de extractos pancreáticos, actúan varias enzimas, por lo que se debe buscar el pH óptimo de la mezcla, que es de 8.33, mientras que el de la tripsina pura es de 7.4.

Para obtener el pH deseado durante el rendido se puede añadir ácido sulfúrico cada dos o tres minutos, o bien usar mezclas de metafosfato y pirofosfato de sodio, que actúan como tampones o añadir el sulfúrico en una sola vez.

Los rendidores que contienen sales de amonio reaccionan con los residuos de hidróxido de calcio adheridos al colágeno, desprendiendo amoníaco y resultando siempre soluciones alcalinas con un pH de 8.3 a 8.5.

Efecto de la concentración del cloruro de amonio.

Cuando el preparado enzimático se encuentra muy diluido (0.1 gr. por litro) la acción de una pequeña cantidad de cloruro de amonio, (5 gr. por litro) produce un efecto notable de inhibición; en cambio, la misma cantidad de sal de amonio en una solución 10 veces más concentrada del preparado no produce ningún efecto apreciable. Si sólo se añade un gramo a la solución diluida hay una notable activación de la acción enzimática.— El cloruro de amonio tiene además la propiedad de destruir las fibras de colágeno, cuando se añade en cantidades superiores a 50 gr. por litro.— El efecto de la remoción de la elastina en el cuero ya curtido, fué determinado por

Wilson y Daub, por la comparación de un cuero rendido con enzimas con otro tratado únicamente con cloruro de amonio en una solución de pH 8, el cual origina la degradación de las partes grasosas del cuero. La mayor diferencia se nota en la parte inicial del curtido vegetal, en el que se observa que las fibras exteriores son curtidas más rápidamente que las interiores y hay una tendencia a la mayor expansión de la superficie que del resto del cuerpo; esta expansión es sólo temporal, mientras los curtientes entran al interior.— Las fibras de elastina tienden a prevenir esta expansión, produciéndose con esto un granulado suave y terso al tacto y pulido a la vista. En el grano de la parte rendida se forman temporalmente arrugas que desaparecen luego, quedando el grano muy suave y con un aspecto sedoso. Al terminarse el curtido, las diferencias entre ambas desaparecen; en el cuero ya terminado la única diferencia es un ligero color en la parte rendida

Aunque a simple vista sus propiedades parecen idénticas, las propiedades físicas de ambos son distintas. La hidrólisis de la elastina produce un efecto de suavidad en el cuero rendido, usándose por esto para productos que requieren como principal característica la suavidad, como serían guantes, fundas, cinturones, etc.- En cambio, para otros usos esto es indeseable pudiéndose suprimir total o parcialmente el rendido, según las características que se deseen.- Los cueros sin rendir se usan para suelas, ciertos tipos de bandas de transmisión, etc.

Digestión del colágeno durante el rendido.

Las enzimas pancreáticas usadas en el rendido pueden efectuar la hidrólisis del colágeno,

pero esta hidrólisis no es de tomarse en cuenta si el pH se mantiene entre 7.5 y 8.5, porque se detiene la acción de las enzimas al terminar la hidrólisis de la elastina.

Si se baja demasiado el pH, o se prolonga demasiado la operación, pueden destruirse cantidades apreciables de colágeno, con las correspondientes pérdidas de firmeza en el cuero.

Conservación de los rendidores comerciales.

Para determinar el grado de descomposición que puedan sufrir estas muestras con el tiempo, Kubelka y Nemeec analizaron muestras previamente probadas y que habían sido guardadas 1, 5, y 10 años, respectivamente. Encontraron que durante el primer año hay una pérdida en actividad que varía entre un 25 y un 40%, permaneciendo posteriormente la actividad más o menos constante. Estas pruebas se efectuaron por el método de Gross Fuld (descrito en este trabajo) y modificado por Kubelka-Wagner.

Acidulación.

El cuero necesita esta última preparación preliminar al curtimiento. El cuero encalado tiene un pH de 12.5 y al finalizar el rendido de 7.5. Como en el curtido con taninos vegetales se necesita un pH de 5 o menos, y cuando se va a curtir al cromo el pH no debe exceder nunca de 4, es necesario efectuar esta acidulación, para colocarlo en el pH ácido que demandan los distintos tipos de curtido que se utiliza.

Esta acidulación puede efectuarse colocando los cueros en una solución de cloruro de sodio 1.0 M., con cantidades variables de ácido sulfúrico, con el fin de que todo material adquiera un grado de acidez uniforme.

Cuando se emplean ácidos juntamente con sales en solución, se les llama a estas mezclas "licores de salmuera", y la operación se conoce como "Pickling" usándose ampliamente cuando se desea preparar el cuero para el curtido con cromo, a cuando se desea conservar los cueros sin depilar por períodos indefinidos antes de su curtido.

Cuando la concentración del ácido es mantenida a 0.05 N. el tiempo de la operación se puede reducir a unas cuantas horas (dos o tres), pero cuando la solución está más diluída, o se trata de cueros pesados, el tiempo de la operación se prolonga a unas 12 horas. Para poder obtener resultados satisfactorios es necesario controlar la concentración del licor, ya sea por medio de un potenciómetro o por medio de titulaciones colorimétricas simples.

También puede usarse para acidular el "empapado o Drenching" que consiste en introducir a las soluciones sustancias fáciles de fermentar, como serían azúcares o salvado. Es muy usado este último, se acostumbra añadirlo de 5 a 10 gr. por litro de agua, manteniendo la temperatura entre 30 y 35 grados C, y permitiendo la fermentación con lo que se forman una serie de ácidos orgánicos que reducen el pH hasta los límites requeridos. Con este sistema, se forman una serie de gases, y si la fermentación es muy fuerte se pueden producir desgarramientos en las fibras manteniéndose, además, los cueros en la superficie del licor. La composición de los gases en la fermentación con salvado es aproximadamente la siguiente:

Anhidrido carbónico	25.2%
Acido sulfhídrico	Trazas solamente
Oxígeno	2.5%

Nitrógeno	25.8%
Hidrógeno	46.5%

Los ácidos producidos en esta fermentación son los siguientes: (dada su concentración por litro de solución).

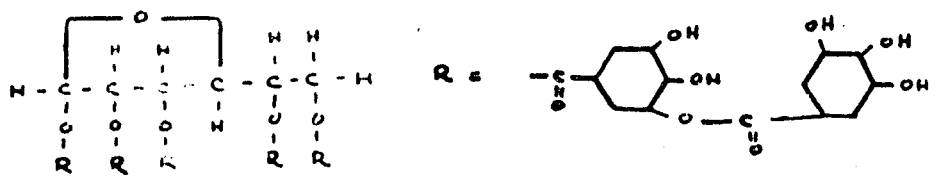
Fórmico	0.0306 gr.
Acético	0.2042 "
Butírico	0.0134 "
Láctico	00.7907 "

Además se forman cantidades insignificantes de otras sustancias de las cuales la más importante es la trimetilamina. Este método tiene el inconveniente de introducir microorganismos que pueden afectar el grano de la piel

Curtimiento.

Es la operación que consiste en tratar los cueros con una sustancia que reacciona con las proteínas de que están formados, transformándolos en material incorruptible.

Hay varios métodos para conseguir ésto: el más antiguo y de mayor uso aun en la actualidad es el empleo de un grupo de sustancias vegetales que responden al nombre genérico de taninos y que son compuestos formados por glucosa y ácido gálico cuya fórmula general es la siguiente:

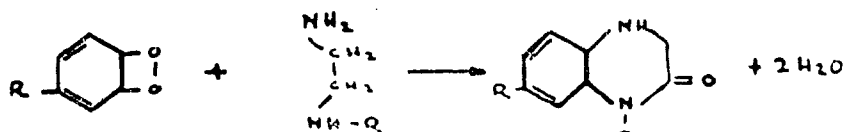


Todos los taninos tienen la propiedad de combinarse con las proteínas del cuero y de precipitar la gelatina de sus soluciones.

El curtido con estos materiales vegetales que resultan de la extracción de las cortezas de ciertos árboles (quebracho, cascalote, mangle, mauto, etc.) se efectúa en tinajas en las cuales se sumergen los cueros el tiempo que dura la operación.— Generalmente se tienen varias tinajas, con concentraciones crecientes de curtiente, por las cuales van pasando los cueros.— En estas tinajas se tiene un dispositivo agitador para lograr la mayor penetración del producto, sin embargo esta agitación no debe ser muy grande ya que podría ocasionar la granulación del tanino.

Dependiendo del tipo de piel que se desea obtener y del tratamiento anterior que hayan recibido, se emplea un determinado tipo de tanino vegetal, no pudiendo reemplazarse libremente unos por otros — Los taninos vegetales están sujetos a la variación en la concentración del principio curtiente en las diferentes muestras usadas, y su acción está sujeta, además al pH, la temperatura, tiempo de curtido, etc.

La forma esquemática de la reacción de los taninos vegetales con las proteínas del cuero es la siguiente:



Tanino

Proteína

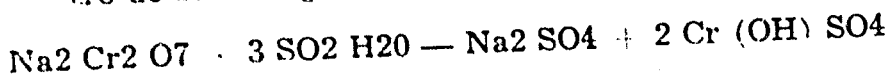
Compuesto incorruptible

Curtido al Cromo.

Es otro de los métodos de curtido.— Es más rápido que el anterior y se efectúa en tambores

rotatorios que contienen el licor curtiente.— Este procedimiento está regido por los mismos factores que el curtido con taninos vegetales.

Uno de los licores de cromo más usados se obtiene del modo siguiente: se hace burbujear anhídrido sulfuroso en una solución de dicromato de sodio según la siguiente reacción:



La sal de cromo reacciona con el colágeno formando una serie de sales denominadas genéricamente "Colagenatos de Cromo", de constitución muy compleja.

Hay además otra serie de sustancias inorgánicas capaces de efectuar las reacciones que requiere el curtido, pero su uso no es muy amplio, prefiriéndose casi siempre cualquiera de los dos métodos anteriormente considerados.— Entre estos métodos pocos usados pueden citarse el curtido por algunas sales de fierro, de aluminio, y por el ácido silícico.

También algunas sustancias orgánicas no incluidas dentro del grupo de los taninos pueden actuar como curtientes; V. gr.: algunos aceites especiales, aldehídos y quinonas.— Su uso también es muy restringido.

Actualmente se acostumbra usar combinaciones de curtientes de cromo o de taninos vegetales con una serie de curtientes sintéticos, obteniéndose resultados satisfactorios, sobre todo en el caso de cueros especiales.

Engrasado.

El engrasado consiste en tratar el cuero ya curtido con un aceite emulsionado o con un jabón, o con un aceite sulfonado, que le proporcionan suavidad, cuerpo y flexibilidad, además de

aumentar su capacidad para el estirado.— Esta operación se lleva a cabo en una serie de tambores rotatorios.— Uno de los aceites más empleado es el de manitas, obtenido de la cocción de las patas, huesos de las tibias y nudillos del ganado vacuno.— Todos estos aceites tienen el peligro de oxidarse o hidrolizarse produciendo manchas indeseables.— Además si no se tiene cuidado de regular el tiempo de engrasado, y este se pasa, hay un aflojamiento excesivo en el cuero, con lo que baja su calidad.

Teñido, secado y acabado.

Son propiamente operaciones complementarias del curtido, las que a pesar de ser secundarias deben controlarse sin embargo cuidadosamente.

En el teñido hay dos modalidades, según se trate de cueros curtidos con taninos vegetales o con sales de cromo. En el primer caso, se pueden remojar para suministrarles el colorante, y en el segundo el teñido se efectúa al mismo tiempo que se curte, usándose colorantes específicos para cada caso.

El secado consiste esencialmente en la eliminación del agua del cuero ya curtido, la que se puede efectuar haciendo pasar sobre él una corriente de aire seco, y en ocasiones caliente, o bien cubriéndolo con una capa de aceites secantes especiales — En todo caso, debe llevarse el control de la velocidad de secado, ya que si este se efectúa muy rápidamente hay un cambio en las fibras, pudiéndose formar partes duras y quebradizas en el cuero.— Si el secado es demasiado lento, se favorece la formación de colonias de hongos, que perjudican con su presencia la calidad del cuero.

El acabado consiste en una serie de opera-

ciones mecánicas tendientes a proporcionar al cuero un aspecto más agradable, o una mayor utilidad en su uso.— Las principales operaciones que incluye el acabado son las siguientes: cepillado, planchado, pulido, prensado, estampado y labrado, así como la aplicación de materiales plásticos, ceras y barnices.

Métodos de Preparación y Purificación de las Enzimas.

Hay varias técnicas para conseguir preparados enzimáticos.— Entre los principales tenemos:

1.—Extracción en una solución después de una destrucción celular.

Se aplica indistintamente para enzimas localizadas en plantas glándulas animales o cultivos de microorganismos.— Se somete la célula a una completa fragmentación mecánica, separándose las enzimas de las partes insolubles de las células mediante un filtrado cuidadoso.— Los componentes solubles pero inactivos que pasaron la anterior separación se insolubilizan mediante la adición de alguna sustancia química (ácido o base) con lo cual pueden ser separadas de las enzimas que no sufren una acción apreciable, considerando para cada caso condiciones particulares.

2.—Por autólisis.

Otro método que permite la separación de las enzimas del resto de la célula, consiste en la provocación de la autólisis o disolución autógena de la célula.— Al morir ésta, una gran parte de la misma es solubilizada por un proceso de

degradación enzimática.— Las enzimas son liberadas entonces.— La concentración de enzimas que se logra es inferior a la del caso anterior, ya que una parte de las mismas enzimas resulta destruída.

3.—Secado y ulterior extracción con disolventes.

Este método se emplea principalmente para la extracción de enzimas de fuentes animales.— Es conveniente efectuar el secado de las substancias celulares ante de su lexiviación.— La ventaja de este método es que permite obtener usualmente elevadas concentraciones de enzimas, y está basado en la desnaturalización que sufren las proteínas celulares al desecarse, procediendo posteriormente a la extracción de la enzima mediante el uso de disolventes específicos.

4.—Diálisis.

Este método permite la separación de los electrolitos y de otras substancias de bajo peso molecular, que se hacen pasar a través de una membrana, que impide el paso de las enzimas.— El grado de pureza no es muy grande con el empleo de este procedimiento, por lo que se le usa para prepurificar las soluciones enzimáticas.

La diálisis es el fenómeno que consiste en permitir el paso de las substancias cristaloides que se encuentran en una solución a través de una membrana, que impide el paso, por otra parte a las substancias en estado coloidal.— Como las enzimas son de naturaleza coloidal, no atraviesan la membrana dializadora, por lo que pueden ser liberadas de electrolitos por este procedimiento.

5.—Precipitación.

Es otro procedimiento muy usado para separar las enzimas de las soluciones en que se encuentran.— Para este objeto se puede usar una gran variedad de sustancias químicas, entre las cuales el alcohol etílico y la acetona son las más usadas, aunque también se emplean muy frecuentemente las sales de los metales pesados, principalmente de uranio, plomo y mercurio, algunos reactivos precipitantes de proteínas, como el ácido tánico.— Tiene el inconveniente de que se pierde una parte de la actividad enzimática, con estas precipitaciones, siendo esta pérdida mayor cuando se emplean las sales de los metales pesados.

Los métodos anteriormente descritos tienen por objeto la separación de las enzimas en las soluciones en que se encuentran.— Aunque todos ellos tienen el mismo fin, sin embargo hay una cierta especificidad en su uso, dependiendo el empleo de uno u otro método del grado de concentración que se desea obtener, la fuente de obtención, el grado de dificultad que presenta la separación, etc.

Con el empleo de estos métodos se logra la separación simultánea de varias enzimas de las soluciones en que se encuentran, pero cuando se desea obtener una sola enzima en estado de pureza, las dificultades aumentan.— Así en el jugo pancreático se encuentran enzimas lipolíticas, amilolíticas y proteolíticas, de las cuales las más importantes son la lipasa, amilasa y tripsina.— Para lograr su separación, una vez extraídas del páncreas, se puede emplear la técnica Willstätter, que está basada en las propiedades de reacción (sumamente delicadas) frente a ácidos y bases, usando como medio de separación geles de

alúmina y suspensiones de caolín.— La lipasa, que tiene propiedades ácidas mucho más pronunciadas que las enzimas que la acompañan, se puede liberar de estas mediante una adsorción en alúmina.— La tripsina se adsorbe con relativa facilidad en un medio electronegativo, por lo cual basta tratar la solución anterior, ya libre de lipasa con caolín en medio ácido, para que se adsorba, dejando libre la amilasa en la solución.

De esta manera, se puede lograr la separación de las enzimas pancreáticas, alternando la adsorción con caolín y alúmina varias veces, para conseguir su total separación, la que sólo ocurrirá en el mejor de los casos, ya que se presentan otras sustancias que pueden modificar y aún invertir la dirección de esta adsorción selectiva.

La tripsina como se ha dicho en el primer capítulo, está formada por varias formas con características específicas, así que todavía puede sufrir un ulterior fraccionamiento.

Selección de los métodos de obtención de las enzimas pancreáticas.

Seleccionamos entre los métodos anteriormente revisados aquel que nos pareció presentar mayor número de ventajas, en lo que se refiere a rendimiento, pureza del producto, facilidad de extracción, costo de la misma, etc., encontrando que es conveniente el empleo combinado de los métodos de "Secado y ulterior extracción con disolventes" y el de "Precipitación".— Cuando se desea obtener el producto industrial se usa el primer método solamente, sin necesidad de precipitar la enzima.

Obtención industrial de las enzimas pancreáticas

El método seguido para la obtención de un producto industrialmente aplicable es relativamente sencillo, pero deben controlarse cuidadosamente toda la serie de factores ecológicos que tienen influencia sobre su rendimiento.

La materia prima de que se parte es el páncreas del ganado porcino o vacuno, glándula de secreción interna situada en la cara posterior del estómago, con un peso aproximado de 100 gr. en el primero y de 250 gr. en el segundo — Comercialmente se le conoce con el nombre de "molleja de adentro", o simplemente de molleja, pudiéndose adquirir con estos nombres en los abastos.— Se le encuentra rodeado de una serie de capas grasas, las que se eliminan mecánicamente, hasta donde sea posible, con el fin de obtener un producto limpio.— Se muele perfectamente, de modo que quede dividido en fracciones muy finas, secándolo con una corriente de aire seco.— Se debe procurar que la glándula molida quede perfectamente extendida, para lograr una mayor superficie de evaporación.— Es necesario que las células sean trituradas durante la molienda por que lo que se trata es de obtener las endoenzimas.

Al producto molido y secado, se le añade de tres a cuatro veces su volumen de agua, a la que se agrega alrededor de 1% de cloroformo, que actúa como antiséptico.— Se deja reposar durante 24 horas a la temperatura ambiente, y manteniendo el pH entre 4 y 5 mediante la adición de ácido sulfúrico (El pH de la muestra original se encuentra entre 7 y 8).

Para la extracción de la solución activa, se procede a prensar el producto, filtrándolo y mezclando el filtrado con una materia de carga en

proporciones variables, dependiendo la cantidad de ésta de la concentración que se quiera obtener del producto — Inmediatamente se procede a secarlo, cuidando que la temperatura no se eleve más de 40 grados C.— Es conveniente efectuar este secado inmediatamente, ya que si la mezcla activa permanece en solución sufre una descomposición microbiana.

Experiencias efectuadas.

A dos kgs. de páncreas fresco de cerdo, se le eliminaron lo más posible las capas grasas con un cuchillo, lo que redujo el peso a 1.400 kgs. aproximadamente; se molieron perfectamente en un molino ordinario de carne, y machacaron completamente en un mortero, poniéndose a secar en una corriente de aire seco producido por una compresora — A la pulpa una vez seca se le añadieron 4 lts. de agua destilada, adicionada de 40 c.c. de cloroformo, ajustando el pH a 5 con ácido sulfúrico.— Se dejó reposar durante 24 horas de la temperatura ambiente (18 a 22 grados centígrados). se prensó, filtró, y dividió en tres partes de un lt. cada una.— Se tomaron tres diferentes substancias de carga para efectuar la experiencia: hidróxido de calcio (industrial), caolín (industrial) y serrín de madera.— A cada una de estas muestras se le añadió un kg. de la substancia de carga, el serrín finamente dividido más o menos a unas 100 o 125 mallas.— Estas muestras a su vez se subdividieron en dos partes iguales usándose cada una de ellas para efectuar el secado de dos maneras distintas:

1) Se colcó la muestra en una máquina de vacío, calentando para producir la eliminación del agua de la mezcla, y teniendo un cuidadoso control de la temperatura, la que se debe impe-

dir que pase de 40 grados C., ya que se produciría la descomposición de la enzima; 2) el otro método recomendado para eliminar el agua sin elevar la temperatura, consiste en hacer pasar por la mezcla una corriente de aire seco producido por una compresora de tipo ordinario, a la que se adaptó una trampa de cloruro de calcio para eliminar la humedad que pudiera traer el aire.— En ambos casos el secado fué satisfactorio, y si bien con el empleo de la corriente de aire se duplica el tiempo de la operación, se tiene en cambio la seguridad de no haber excedido la temperatura marcada.— Un método recomendable para la desecación del producto podría ser una combinación de los dos anteriores, usando la evaporación al vacío como paso inicial para eliminar la mayor parte de la humedad, y finalizando el secado con el uso de la corriente de aire.— Las mezclas una vez secas, quedan en forma de terrones los que se pueden pulverizar fácilmente.

Muestra A. — Con hidróxido de calcio como material de carga:

Se tomaron 750 gr. de la piel de diferentes regiones, se cortaron en trozos pequeños, se lavaron perfectamente y a continuación se pasaron al batán de pruebas (un cilindro rotatorio de material plástico), con el 200% de su peso de agua y el 2% de la muestra, permaneciendo la piel en el batán durante una hora.— Se lavó nuevamente y se pasó a un licor de quebracho de 2 grados de concentración, permaneciendo en éste durante 12 horas. al cabo de las cuales se observó que la muestra no había tenido ningún efecto apreciable como rendidor.— Esto se debió, probablemente a la materia de carga que se empleó,

la cual al ponerse en solución desarrolló un pH de 12, fuera del límite al que actúan las enzimas pancreáticas de la mezcla.

Muestra B.— Con Caolín.

Se repitió exactamente la operación anterior, sólo que en este caso se buscó un pH más o menos de 8, notándose que la mezcla sí tiene un poder hidrolizante sobre las proteínas del cuero, aunque su efecto rendidor no fué tan satisfactorio como cuando se usó serrín como material de carga.

Muestra C — Con serrín de madera.

Se obtuvo un mejor resultado que con la muestra B, cuidando de mantener el pH entre 7.5 y 8.5, que es el óptimo de acción de la mezcla de enzimas pancreáticas.

En cada una de las tres muestras se añadió sulfato de amonio, por el efecto activador que estas sales producen

Las pruebas anteriores de rendido nos permiten afirmar la presencia de estas enzimas en las mezclas preparadas por el método industrial.— Como una comprobación, se efectuaron las siguientes pruebas:

El páncreas fresco es limpiado de la grasa hasta donde sea posible por medios mecánicos.-- Como el producto todavía contiene cantidades apreciables de grasa, las que deben eliminarse por interferir la presencia de ésta en las observaciones, ya que no se puede eliminar ni por filtraciones, ni por centrifugaciones, por tratarse de partículas sumamente finas, se trata con un disolvente químico que elimine la grasa sin atacar las enzimas; con este fin usamos éter de petróleo, con el cual se trata el páncreas, removien-

do y agitando durante una hora, al cabo de la cual se repite el tratamiento con el mismo éter de petróleo.— Se deja evaporar a la atmósfera el resto de éter que pudiera haber quedado, y se macera, seca y extrae con agua adicionada de cloroformo siguiéndose el mismo procedimiento que el empleado en la obtención industrial.— Al filtrado en vez de añadirle un material de carga, se le adiciona alcohol de 96 grados hasta precipitarlo.— Se principia a notar una ligera opalescencia cuando se ha añadido más o menos el 10% en volumen de alcohol etílico, aumentando ésta hasta que cesa la precipitación cuando se lleva adicionado un 40% de alcohol.— Se dejó reposar la mezcla durante 24 horas, para lograr la separación de las enzimas, las que son precipitadas del resto de la solución agua-alcohol-cloroformo por decantación, seguida de centrifugación a 1700 revoluciones, durante 5 minutos.— Una vez que se tiene la preparación enzimática se procedió a hacer frotis de ella en porta-objetos, fijando la preparación por medio del alcohol, sin calentar, teniendo además la precaución de limpiar con éter los porta-objetos para eliminar la grasa que pudieran contener.— Al ser observadas estas preparaciones al microscopio, se encontró que no se obtuvo la enzima en estado de pureza, ni fué posible eliminar totalmente la grasa, ya que se notan partes representativas del tejido animal y células grasas.— También fué posible la localización de unos cristales con la forma típica de la tripsina, y otros de forma cristalina semejantes a los de la quimotripsina, aunque estos se apreciaron con menor claridad.— Esta prueba en combinación con las anteriores permite establecer con certeza la presencia de estas enzimas en el páncreas, que es la materia prima de que se parte para su obtención.

CAPITULO TERCERO.

Medición de la actividad proteolíticas de los preparados pancreáticos.

El cálculo de la actividad de las enzimas que se encuentran en los preparados pancreáticos activos puede ser determinado experimentalmente, tomando como base una muestra determinada a la que se le asigna un valor unitario, que servirá de base para comparar las demás muestras entre sí.

En las soluciones pancreáticas activas hay varios tipos de enzimas, de las que ya hemos hablado, nosotros solo determinamos las enzimas proteolíticas por ser estas las que nos interesan.

Como en el caso en que se trató de la obtención de estas enzimas, vamos a considerar una serie de métodos que permiten relacionar la actividad enzimática de una muestra a otra, eligiéndose de entre estos métodos los más convenientes para efectuar las experiencias de laboratorio.

1.— Método de T. F. Macrae.

Este método fué descrito en 1933, y se emplea para determinar directamente la actividad proteolítica.— Está basado en el incremento de

acidez que sufre la muestra al producirse la hidrólisis de una determinada cantidad de gelatina por medio de la enzima proteolítica.

Descripción del método.

A 6 c. c. de una solución al 10% de gelatina se le añaden 1.6 c.c. de una solución de citrato de sodio 0.2 M., la mezcla debe tener un pH de 5, para ajustarlo se usa ácido acético 1.0 N. y se calienta la mezcla a 40° C.— Se añade la solución enzimática (previamente medida y pesada) y la mezcla total se diluye a 10 c. c.— Se agita perfectamente la muestra para lograr su total homogenización, y se toma una alícuota de 2 c. c., a la que se le añaden 18 c. c. de alcohol etílico absoluto y previamente calentado a 50 o 60° C., la gelatina precipita, y la muestra es titulada volumétricamente con KOH 0.05 N. en solución alcohólica al 90%.

Como indicador se adicionan 5 o 6 gotas de timolftaleína, —solución al 0.5% en alcohol—, y se termina la titulación cuando la mezcla haya adquirido un color azul tenue permanente.— Durante esta titulación es necesario estar agitando continuamente.

Se toma ahora otra de las alícuotas, también de 2 c. c. y se mantiene en digestión durante 24 horas a 40° C. al cabo de las cuales se titula exactamente igual que la primera.— El resultado se considera tomando en cuenta el aumento de acidez que haya sufrido esta última muestra.

2.—Método de Lohlein-Volhard.

El fundamento de este método es lo siguiente: como en el anterior, se considera el incremento de acidez que sufre una muestra de caseína al

ser hidrolizada por una cantidad medida de la enzima.

La caseína es una proteína, que como ya se ha dicho está formada por la unión de varios aminoácidos: la enzima produce el desdoblamiento de ésta proteína dejando en libertad radicales —NH_2 y radicales —COOH , los primeros básicos y los segundos ácidos; sin embargo los radicales —COOH dominan la reacción del hidrolizado produciendo un incremento de acidez, que es lo que se titula.

Soluciones empleadas:

1.—Solución alcalina de caseína.— Se prepara disolviendo 10 gr. de caseína (preferentemente la Hammerstein) en una solución diluida de NaOH, ajustando su pH a 8.4 y diluyendo todo a un litro.

2.— Solución 0.2 N de HCl.

3.— „ 0.1 N de NaOH.

4.— Solución al 10% de sulfato de sodio.

Como indicador se usa α naftolftaleína en alcohol.

Procedimiento.

Se pesa 0.1 gr. del producto en un pesafiltros de 50 c. c. y se le añaden 10 c. c. de agua destilada, la solución se tiene a 37°C . durante 15 minutos, al cabo de los cuales se le añaden 5 c. c. de la solución de caseína, poniéndolo a digerir durante una hora también a 37°C .— Transcurrido este tiempo y para detener la acción enzimática se añaden 5 c. c. de la solución de HCl

y 10 c. c. de la solución de sulfato de sodio para precipitar la caseína que haya quedado sin digerir.— Se deja reposar unos minutos y se filtra.— A 10 c. c. del filtrado se le añaden una gotas del indicador y la solución es titulada con NaOH hasta el primer cambio definitivo de color.

Se necesitan titular dos muestras más para poder determinar el ácido clorhídrico y el que está aún libre, y así poder sacar la acidez que se produce por el desdoblamiento de la caseína al ser hidrolizada por la enzima.

3.— Método de Gross-Fuld.

Es un método de comparación, por lo que se necesita emplear en combinación con otros métodos.

Estas muestras se titulan de la siguiente manera:

Solución A.— A 5 c. c. de la solución de caseína se le añaden 10 c. c. de agua destilada y 10 c. c. de la solución de sulfato de sodio, determinándose la acidez libre como en la muestra que contenía el rendidor.

Solución B.— Se pesa 0.1 gr. del rendidor o preparado enzimático, se le añaden 10 c. c. de agua destilada y unas gotas de indicador y se titula con NaOH la cantidad de acidez que corresponde a la sal de amonio que lleva el preparado.

Conocidos estos valores, se puede efectuar el balance neto de acidez determinándose por el incremento de ésta la concentración de la enzima en la muestra.— El resultado se expresa por c. c. de la solución de NaOH usada para neutralizar el incremento de acidez producido por la digestión de la caseína y calculado por gramo de rendidor.

Por este método es conveniente efectuar la digestión de la caseína al pH óptimo de la mezcla enzimática que es de 8.3 más o menos.

Procedimiento:

Se pesa 0.1 gr. de caseína y se le añaden 5 c. c. de una solución 0.1 N de sosa y 25 c. c. de agua destilada; la mezcla se lleva a ebullición para disolver la caseína, se deja enfriar y se ajusta al pH deseado —8.3— con disolución 0.1 N de HCl, diluyéndose la solución a 100 c. c.

También se prepara por separado una solución alcohólica de ácido acético de la siguiente composición:

Una parte de ácido acético, 49 partes de agua destilada y 50 partes de alcohol de 96°.

Por otra parte se preparan soluciones de diferentes concentraciones de enzimas, las que se colocan en 10 tubos de prueba, igualando en todos el volumen con agua destilada.— A cada uno de estos tubos se les añaden 2 c. c. de la solución de caseína: — se debe procurar mantener la temperatura a 38° C, después se colocan los tubos en una estufa a 38° C. durante una hora para digerir la caseína.— Una vez efectuada ésta se añadan a cada uno de los tubos 6 gotas de la solución alcohólica-acética y se toma como base para el cálculo de la actividad proteolítica de la enzima aquel tubo en que se observa un principio de precipitación.

Selección de los métodos.

En esta selección se deben tener en cuenta varios factores: rapidez y precisión del método empleado, forma en que se encuentra la enzima cuya actividad se quiere determinar, etc.— La segunda de las razones expuestas es la que influ-

yó en la selección del método: el de T. F. Macrae, está diseñado para las determinaciones de las enzimas en su forma pura.— En cambio los otros métodos se adaptan más a la finalidad perseguida, ya que se usan para determinaciones de muestras comerciales; el de Lohlein-Volhard concreta más su uso ya que es específico para la determinación de la actividad proteolítica de rendidores comerciales a base de tripsina y sales de amonio.— El de Gross-Fuld —como ya se ha indicado— es un método que se emplea en combinación con otros y se puede usar muy cómodamente para la determinación de la actividad de productos comerciales que contengan enzimas proteolíticas.— Este es un método muy usado en las determinaciones industriales rutinarias, gracias a la rapidez y sencillez que su uso implica.

Para efectuar las pruebas elegimos el segundo método, y como una comprobación el tercero.

Como ahora se trata de establecer una relación entre el producto obtenido y algunos productos industriales, se debe tener toda la serie de datos que ligen: el peso del páncreas, cantidad de la solución, materia de carga añadida, etc., que permitirán repetir la experiencia en cualquier momento y establecer una conclusión sobre la importancia de su fabricación.— La obtención es la misma descrita en el capítulo anterior, y las cantidades empleadas fueron las siguientes:

Glándula pancreática de cerdo con capas grasas	1,960	gr.
" " " limpia	750	"
Agua añadida	2,070	"
Cloroformo industrial	40	c c.
Acido clorhídrico Q. P.	3	"
Cloruro de amonio industrial	20	gr.

Después de filtrado se tomó el peso del residuo. . . . 1,015 gr. y del extracto. . . . 1855 gr.

El extracto activo se mezcló con serrín de madera y con caolín en las siguientes proporciones: A) Serrín 1,000 gr. y extracto 975 gr.— B) Caolín 370 gr. y extracto 110 gr.— El residuo que se elimina lleva todavía una cierta cantidad de extracto activo, que en una obtención industrial sería factible aprovechar por un prensado y colado más completo.

Relacionando los pesos de los productos A y B con el peso del páncreas original, se encontró que el serrín se añadió en un 289.93% y el caolín añadido representa un 951.15% del páncreas desengrasado que se encontraba en la solución activa.

Conocidos estos datos se procedió a preparar las soluciones necesarias para efectuar el método de Lonlein-Volhard.

1.—Solución de caseína: 40 gr. por litro de solución y con un pH aproximado de 8.6.

2.—Solución al 10% de sulfato de sodio.

3.—Solución de NaOH de normalidad.
0.12882.

4.—Solución de HCl de normalidad. . . . 0.219

Preparadas estas soluciones se efectuó el método titulando seis diferentes muestras que se van a comparar entre sí.

A.—Producto obtenido experimentalmente y usando el serrín como carga.

B.—Producto experimental con caolín como carga.

C.—Producto Industrial No. 1

D.—Producto Industrial No. 2

E.—Producto Industrial No. 3

F.—Producto Industrial No. 4

El producto (1) tiene que haber perdido algo de su actividad ya que su fecha de fabricación fué en 1947.— Los otros tres productos son de fabricación reciente, no han perdido nada de su actividad por la acción del tiempo.

Con cada una de las muestras se efectuó el método, repitiéndolo 3 veces para eliminar hasta donde fué posible los errores de manipulación y lectura, y sacando un promedio de los valores obtenidos.

El indicador recomendado por el método no fué posible conseguirlo en el mercado, por lo que usamos como sustituto el rojo de fenol que tiene los límites de vire muy cercanos a los de la α naftolftaleína.

La α naftolftaleína vira de 7.2 a 8.6 y el rojo de fenol de 6.8 a 8.4.— Con el empleo de éste último es conveniente para compensar la diferencia de vire, cargarlo hacia el lado alcalino.

Cálculos.

Al efectuar los cálculos vamos a considerar las humedades que contengan los productos para dar los resultados por gramo de muestra en base seca.

Para evitar repeticiones en la descripción de los cálculos se consideran solamente los necesarios para determinar la concentración de enzimas en el producto experimental (A), y presen-

tando los resultados de los otros productos valorados en una tabla, con lo que se tiene la facilidad de poder establecer con mayor claridad las comparaciones entre un producto y otro.

Según la técnica se tendrá:

Solución A:

- 1 — 2.1 c. c. de ácido clorhídrico 0.219 N.
- 2 — 2.1 " " " " "
- 3 — 2.1 " " " " "

Solución B:

- 1 — 0.05 c.c. de sosa caústica 0.1288 N.
- 2 — 0.05 " " " " "
- 3 — 0.05 " " " " "

Con la solución C. se hicieron dos lecturas cada vez que se repitió el método:

- 1 — 1.1 y 1.35 c.c. de sosa caústica 0.1288 N.
- 2 — 1.35 " 1.35 " " " " "
- 3 — 1.35 " 1.4 " " " " "

Este último valor se obtuvo de la titulación de 10 c.c. de la solución resultante, de separar la caseína sin digerir y precipitada con el sulfato de sodio, por filtración.— La solución original está formada por: 5 c.c. de la solución alcalina de caseína, 10 c.c. de agua, 5 c.c. de la solución valorada de ácido clorhídrico y 10 c.c. de la solución de sulfato de sodio, que en total nos dá un volumen de 30 c.c.— La preparación enzimática se añade en forma sólida, así que no afecta el volumen final de la solución.

Para tener un resultado correcto es necesario multiplicar por 3 el valor obtenido al titular la solución C.

Promedios:

- A — 2.1 c.c. de ácido clorhídrico 0.219 N.
 B — 0.05 c.c. de sosa caústica 0.1288 N.
 C — 1.375 — 3 c.c. de NaOH 0.1288 N.

Para obtener el incremento de acidez que determina el grado de concentración de las enzimas proteolíticas en el preparado pancreático se efectúa un balance neto de acidez.

Miliequivalentes de HCl	Miliequivalentes de NaOH
1.—Por titulación de la muestra B	Por titulación de la muestra A
$0.05 \times 0.1288 = 0.00644$	$2.1 \times 0.219 = 0.4600$
2.—Por el HCl que se añade para detener la acción enzimática	Por titulación total de la muestra C.
$5.0 \times 0.219 = 1.095$	$1.375 \times 3 \times 0.1288 = 0.5313$
Total = 1.10144	Total = 0.9913

$$\Delta H1 = 1.10144 - 0.9913 = 0.11014 \text{ m. e. de HCl}$$

$\Delta H1$ es el incremento de acidez producido por 0.1 gr. del preparado pancreático.— Para expresarlo por gramo de rendidor el valor obtenido se multiplica por 10 resultando $\Delta H2$.

$$\Delta H2 = 1.1014 \text{ m. e. de HCl.}$$

El contenido de humedad de las muestras es variable.— Para tener una idea más concreta de las concentraciones de las enzimas en el preparado comercial, es conveniente dar los valores en base seca.

Para obtener la humedad en el producto de que está tratando, se pone una cantidad exactamente pesada del mismo en una estufa durante una hora y manteniendo la temperatura entre 100 y 105 grados C.; observándose por diferencia de pesos el correspondiente al agua evaporada.

Peso del pesafiltros vacío = 27.3512
 " " " con muestra húmeda = 30.3512 gr.
 " " " " " seca = 30.1280 "
 Humedad = 0.223 gr

En cada una de las muestras se efectúa la misma operación.

$$\text{La humedad \%} = \frac{0.223 \times 100}{3.000} = 7.44$$

El peso de la muestra de rendidor seco es:
 0.100 gr. — 0.0744 gr = 0.09256 gr.

Para obtener el aumento de acidez por gramo de substancia activa AH3 añadida se hace la siguiente relación:

1.1013 m. e de HCl equivalen a 0.9256 gr.

AH3 m. e. de HCl equivalen a 1.0000 gr.

$$\text{AH3} = \frac{1.1013}{0.9256} = 1.1898 \text{ m. e. de HCl}$$

Este valor es el que se toma como base, dándosele un valor del 100% y relacionando los otros productos a éste.

Tabla obtenida de la titulación de las muestras:

Los valores de las humedades en cada uno de los seis productos son los siguientes:

Muestra o producto experimental	con serrín ==	7.44 %
Muestra o producto experimental	con caolín ==	0.92 "
Muestra del producto industrial N° 1	==	6.7 "
" " " "	N° 2 ==	0.76 "
" " " "	N° 3 ==	10.56 "
" " " "	N° 4 ==	4.03 "

Las humedades están dadas en % en peso.

Producto	Solu- ción A	Solu- ción B	Solu- ción C	m.e. de HCl	m.e. de NoOH
Prod. ex- perimental con serrín	2.1	0.05	1.375	1.10144	0.991
Prod. ex- perimental con caolín	2.1	0.175	1.30	1.1175	1.0395
Prod. Ind. 1	2.1	0.25	1.10	1.1072	0.8850
Prod. Ind. 2	2.1	0.175	1.45	1.1775	1.0016
Prod. Ind. 3	2.1	0.05	1.575	1.10144	1.0696
Prod. Ind. 4	2.1	0.05	1.40	1.10144	1.00096
Producto		AH1	AH2	AH3	Actividad comparada

Prod. exp. con serrin	0.11014	1.1014	1.1898	100.00 %
Prod. exp. con caolin	0.07803	0.7803	0.7875	66.38 %
Prod. Ind. 1	0.22220	2.2220	2.3801	200.00 %
Prod. Ind. 2	0.11592	1.1592	1.1699	98.32 %
Prod. Ind. 3	0.03294	0.3294	0.3683	30.95 %
Prod. Ind. 4	0.10048	1.0048	1.0473	87.98 %

Método de Gross—Fuld.

Este método es como se ha dicho, comparativo, y de fácil realización aunque no muy exacto. Nosotros lo usamos para comparar los dos productos comerciales 1 y 2 y los productos obtenidos prácticamente.

Pesamos 0.200 gr. de cada uno de estos productos y los disolvimos en 20 c.c. de agua destilada, o sea que a cada c.c. de esta solución o suspensión; (según el producto de que se trate, los comerciales, por estar adsorbidos sobre cloruro o sulfato de amonio se disuelven y en los experimentales queda en suspensión la materia de carga), le corresponden 0.010 gr. de la muestra.— Tomamos cuatro series de tubos de ensayo (de 10 tubos cada una) procurando que todos fueran iguales para evitar hasta lo posible errores de apreciación, por diferentes diámetros o transparencias y se numeran de 1 a 10, colocándose diferentes concentraciones de la enzima en cada tubo, al primero se le añaden 0.3 c.c. de las soluciones o suspensiones representativas de cada muestra y al último 3.0 c.c. de las mismas, variando los intermedios de 0.3 en 0.3 c.c.— Para tener igual volumen en todos los tubos vamos completando éste hasta 3 c.c. con agua destilada

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Agua	2.7	2.4	2.1	1.8	1.5	1.2	0.9	0.6	0.3	0.0
Rendidor	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0

El substrato sobre el que va a actuar la enzima es la caseína; de la que preparamos una solución con las siguientes características: Pesamos exactamente 0.1 gr. de caseína y la disolvimos en 5 c.c. de NaOH 0.1288 N y 25 c.c. de agua, hirviéndola durante unos 10 minutos para lograr su total disolución, la dejamos enfriar y reposar y le añadimos HCl hasta lograr un pH aproximado de 8.3, diluyéndolo todo con agua destilada hasta un volumen de 100 c.c.— El indicador alcohólico-acético lo hicimos en las proporciones que indica el método .

El fundamento de este método es el siguiente: La caseína es soluble en un medio alcalino, al suprimirse éste por la adición de algún ácido, sufre una precipitación, notándose un enturbiamiento en la solución que la contiene.— La caseína ya preparada se deja hidrolizar durante una hora,, en aquel tubo de la serie y en los siguientes en que ésta hidrólisis sea completa, se nota que no hay ningún enturbiamiento, permaneciendo la solución completamente clara.— Se toma como base el último de los tubos en que permanece la solución clara.

La turbiedad producida se debe al incremento de acidez que sufre la caseína al ser tratada por el preparado enzimático. —El error del método estriba en la dificultad para determinar donde permanece clara la solución y donde principia a enturbiarse, ya que la diferencia entre un tubo y otro es muy pequeña.

Los resultados que obtuvimos fueron los siguientes:

- A—Producto experimental con serrín 5
- B—Producto experimental con caolín entre los tubos 7 y 8
- C—Producto Industrial Núm. 1 2
- D—Producto Industrial Núm. 2 4

La comparación entre los dos métodos efectuados, nos permite decir, por los valores obtenidos de este último, que no proporciona la exactitud necesaria para establecer la capacidad hidrolítica de una muestra comercial, dándonos solo una idea —bastante aproximada— acerca de esta actividad.— Posiblemente la exactitud del método aumente cuando se comparan dos muestras o más del mismo producto, pero en este caso, en que hay una variación en las materias de carga y en las composiciones de los productos comparados, no puede usarse con la seguridad de obtener un resultado aceptable para análisis industriales.

Producto	Método de Lolhein-Volhard.	Método de Gross-Fuld.
A	100.00 %	100.00 %
B	66.38 %	66.33 %
C	200.00 %	250.00 %
D	98.32 %	125.00 %

CAPITULO CUARTO.

Discusiones.

Esta parte del trabajo es la más importante y su desarrollo está basado en el estudio anterior, y nos permitirá hacer conclusiones que definen la posibilidad de establecimiento de una planta productora de rendidores a base de enzimas pancreáticas.

La parte económica de la instalación de la misma no se ha estudiado en este trabajo por estar fuera del tema que se desarrolló.— Para poder afirmar categóricamente la conveniencia o inconveniencia económica del producto que se desea obtener, es necesario estudiar a fondo los siguientes puntos:

- 1.—Costo de la materia prima.
- 2.—Costo de la instalación de la planta.
- 3.—Costo de la maquinaria (incluyendo su conservación y reparación).
- 4.—Costo de la operación.
- 5.—Costo de la mano de obra.
- 6.—Toda la serie de costos que sin intervenir directamente en la fabricación del producto deciden el precio del mismo.

Nosotros sólo veremos el asunto desde el

punto de vista mas general, considerando las dificultades técnicas que pudieran presentarse.

1.— Materia Prima.

La materia prima se encuentra en la cantidad necesaria para el establecimiento de una planta, que alcanzaría a cubrir las necesidades del mercado nacional. y una vez satisfecho éste, aún quedaría una parte disponible para la exportación.— La materia prima básica en el proceso es el páncreas, pudiéndose usar indistintamente el del ganado porcino o vacuno.— Esta glándula se usa en nuestro medio como fuente de alimentación barata y de baja calidad, su sustracción como tal, no sería un obstáculo por ser poco solicitada, además, al transformarse en un producto de aplicación industrial. aumentaría su valor original.— El número de cabezas de ganado que se sacrifican en los rastros oficiales del país, alcanza a cubrir perfectamente el gasto que del producto transformado se hace.

De las otras materias primas que se emplean en su elaboración, son las sales de amonio y las materias de carga las más importantes. Las materias de carga, además de encontrarse en abundancia en el mercado, pueden dentro de ciertos límites ser reemplazadas unas por otras, por lo que su obtención no es ningún problema.— En cuanto a las sales de amonio (producto muy importante en la elaboración de este producto, ya que son esenciales por la acción activadora que ejercen, pudiendo también ser empleadas como carga) no hay ninguna dificultad para conseguirias en el comercio, últimamente se ha instalado una planta de sulfato de amonio para fines agrícolas, pero perfectamente utilizable en el proceso con una capacidad de producción de cerca de 200 toneladas diarias.

Las otras sustancias que entran en el proceso, y que pueden ser consideradas como materias primas, serían el cloroformo, ácidos clorhídrico y sulfúrico que también pueden encontrarse sin dificultad en el mercado.

Uno de los puntos en que se debe tener cuidado es en la cantidad y calidad del agua que se va a utilizar en el proceso, la solución a esto estará en la localización de la planta, buscándose que haya agua suficiente y de una calidad satisfactoria.

2.—Lugar de colocación de la planta.

En este aspecto también consideramos la parte técnica, sin tomar en cuenta la parte económica o social que su localización represente.

Hay dos factores que influyen principalmente en esto:

- a) Cantidad y calidad del agua de que se disponga.
- b) Facilidad de acceso del páncreas.
- a) Esta parte ya está considerada en el inciso que trata de la materia prima.
- b) En cuanto a la facilidad de acceso del páncreas, es muy importante que éste llegue al tratamiento perfectamente conservado .

Para ésto hay dos soluciones:

1.—Colocar la planta en un departamento anexo al rastro o matadero que va a proporcionar la materia prima, asegurándose de esta manera que no ha sufrido ninguna descomposición y empleándose completamente fresca con lo que se evita la pérdida de actividad que pueden sufrir las enzimas al sobrevenir la descomposición bacteriana.

2.— Buscar la colocación de la planta en algún lugar conveniente, aún cuando no esté en las inmediaciones de ningún rastro, y recibir de éstos el páncreas perfectamente refrigerado.

3.—Proceso de elaboración.

El proceso va íntimamente ligado con la maquinaria y equipo que se necesita para la producción, por lo que lo veremos primero para sacar de él las características del equipo.

Este proceso no es difícil pero hay necesidad de llevar un control bastante cuidadoso de algunas de sus operaciones.— Ya ha sido descrito en capítulos anteriores, por lo que sólo mencionaremos los pasos de que consta, y algunos valores cuyo control se debe vigilar.

a). Molienda y maceración del Páncreas.

Debe ser lo más completa que sea posible a fin de lograr el máximo de rendimiento durante la extracción.

b) Secado de la glándula macerada.

Este es un paso que se puede suprimir, sin embargo es conveniente efectuarlo para facilitar la extracción, debe buscarse que éste sea lo más completo posible, usando siempre una corriente de aire seco o algún otro medio que no eleve la temperatura a más de 40° C.— El tiempo de operación no debe pasar de dos a tres horas.

c) Extracción del producto activo.

Se debe cuidar la calidad del agua, ya que aunque no es normal, pudiera contener ésta algún inhibidor o tóxico.— El tiempo de extrac-

ción debe ser de 24 horas manteniendo la temperatura entre los 15 y 25° C. y el pH de extracción entre 4 y 5.

d) Prensado y filtrado.

Tiene por objeto separar el extracto activo del resto de la materia que hay en suspensión (grasa, tejidos, etc.).— Es conveniente que el filtrado sea lo más completo posible, para evitar pérdidas de la substancia activa que podría irse con el residuo sólido.

e) Mezclado con la carga.

En este mezclado, la carga puede añadirse en muy diferentes proporciones, según la concentración que se desee tener en el producto terminado, lo que debe buscarse siempre, es que quede perfectamente incorporado con el material de relleno.

f) Secado.

Esta operación también debe efectuarse a temperaturas inferiores a 40° C. para no descomponer la enzima.— Es conveniente el empleo de una corriente de aire seco.

g) Molido.

Una vez seco el producto debe molerse perfectamente de tal manera que quede un polvo bastante fino que pase cuando menos la malla 100.— Esta molida además de dar la finura requerida, ayuda a lograr la homogenización del producto, proporcionando una aplicación más cómoda y exacta del mismo.

Además hay otra serie de operaciones que se necesitan efectuar antes de enviar el produc-

to al consumidor, como son: el pesado, empacado, etc., pero éstas pueden llevarse a cabo de una manera completamente normal.

4.—Maquinaria y equipo necesario para montar la planta.

Una vez visto el proceso se nota que el equipo no es complicado.— Como partes esenciales tenemos necesidad de instalar: molinos de carne, compresoras de aire o algún otro medio para lograr una corriente del mismo, como podrían ser extractores de aire, etc.; tanques de extracción provistos de un dispositivo agitador; revolventoras o mezcladoras, molinos ordinarios para el producto terminado y alguna otra maquinaria sencilla.

Todo ésto puede ser adquirido en el mercado local, y si no fuera posible conseguirlo de las características deseadas, puede ser diseñado y encargado a las casas constructoras.— Esta es en general la maquinaria o equipo indispensable para la fabricación del producto, variando únicamente las unidades según la capacidad de producción de la planta.

5.— Subproductos.

Los únicos subproductos del proceso serían, la grasa que viene con el páncreas, y que representa un buen porcentaje del peso de la materia prima; y el residuo que resulta del prensado, y del filtrado o colado de los jugos activos.

Para la primera cuando menos, sería factible mediante transformaciones no muy costosas fabricar algún tipo de jabón o detergente, que permita abaratar el producto principal.

6.—Mercado.

El mercado que tiene este producto en México, es lo suficientemente amplio para justificar la instalación de una planta que lo produzca, siempre y cuando el producto obtenido pueda competir ventajosamente en calidad y precio con los productos importados.

En la actualidad, todo el que se consume proviene del extranjero.— Según los datos proporcionados por la "Armour Research Foundation" y el Banco de México, se sabe que en el año de 1940 el 100% del producto era importado.

CONCLUSIONES.

- 1.—Extracción: Se observó en el curso de este trabajo que la extracción de preparados activos por el método de "Secado y ulterior extracción con disolventes" es satisfactoria.
- 2.—Carga: En las experiencias reseñadas se observó que el mayor rendimiento es obtenido usando serrín como adsorbente, y sales de amonio como carga.
- 3.—Control de la actividad: Para medir la actividad enzimática en preparados pancreáticos, se puede usar el método de Lohlein—Volhard, con bastante exactitud; cuando se tiene una base de comparación, se usa el método de Fuld—Gross.
- 4.—Materia prima: Por los datos estadísticos a los que se hace referencia, se observa que se dispone de suficiente cantidad.
- 5.—Volumen de consumo: Dado que la industria peletera en México está bastante desarrollada, el producto tendría suficiente mercado.
- 6.—Importancia que tendría la instalación de la planta: Ayudar a la independencia industrial de México.

BIBLIOGRAFIA.

- ARMOUR RESEARCH FOUNDATION.**— Curtiduría.
Monografías Industriales del Banco de México — 1949.
- ARMOUR RESEARCH FOUNDATION.**— Curtiduría.
Vol. IV. de la Rev. Problemas Agrícolas e Industriales de México.
Editorial del Banco de México. — 1949.
- Baldwin Ernest.**— *Dynamic Aspects of Biochemistry.*
MacMillan Co. New York 1947.
- Elvehjem C. A. and Wilson P. W.**— *Respiratory Enzymes.*
Burgess Publishing Co.— Minneapolis, Minn 1939.
- Fieser L. y Fieser.**— *Química Orgánica.*
Ed. Atlante, México, D. F. 1948.
- Galán Román.**— *Curso de Química.*
Cultural S. A. Habana, Cuba.— 1944.
- Gortner Ross Aiken.**— *Outlines of Biochemistry.*
John Wiley & Sons., Inc. New York.
Chapman & Hall, London, 1944.
- Hodgman Charles D.**— *Handbook of Chemistry and Physics.*
Chemical Rubber Publishing Co.
Cleveland, Ohio.— 1948.
- H. Perry John** — *Chemical Engineers' Handbook.*
Mc. Graw—Hill Book Co. Inc. New York and London.— 1941.
- Mac Dougall Frank.**— *Physical Chemistry.*
The Mac Millan Co. New York.— 1949.

- Orozco D. Fernando.**-- **Análisis Químico Cuantitativo**
Editorial Porrúa, S. A. México, D. F.—
1949.
- Prescott S. C. And Dunn C. G.**— **Industrial Microbiology.**
Mc Graw—Hill Book Co. Inc. New York,
Toronto, London.— 1949.
- Tauber Henry.**— **Enzyme Chemistry.**
John Wiley & Sons., Inc. New York.
Chapman & Hall, London, 1944.
- Tauber Henry.**— **Enzyme Technology.**
John Wiley & Sons., Inc. New York.
Chapman & Hall, London, 1944.
- T. F. Macrae.**— **Biochemical Journal.**
Volumen 27.— 1933.
- Waldschmidt — Leltz Ernest.**— **Enzyme Actions and Properties.**
John Wiley & Sons., Inc. New York.
Chapman & Hall, London, 1929.
- Wilson, John Arthur.**—**The Chemistry of Leather Manufacture.**
The Chemical Catalog Co. Inc. 1923.