



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán

**Metodología de Investigación Documental y
de las Prácticas Demostrativas de Apoyo en
la Asignatura del Paquete Terminal de
Enzimas de Uso Alimentario**

T E S I S
Que para obtener el título de:
INGENIERA EN ALIMENTOS
p r e s e n t a
DINORAH CRUZ DOMINGUEZ

ASESORES:

- I.B.Q. J. Francisco Montiel Sosa
- Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda
- Q.F.B. S. Patricia Miranda Castro

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx. 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

271787



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Metodología de investigación documental y de las
prácticas demostrativas de apoyo en la asignatura
del Paquete Terminal de Enzimas de Uso Alimentario
 que presenta la pasante: Dinorah Cruz Domínguez
 con número de cuenta: 8524922-0 para obtener el TITULO de:
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 06 de noviembre de 1998

PRESIDENTE Q.F.B. S. Patricia Miranda Castro

VOCAL I.A. Alfredo Alvarez Cárdenas

SECRETARIO Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz

PRIMER SUPLENTE I.A. Laura M. Cortazar Figueroa

SEGUNDO SUPLENTE I.B.Q. Ma. de la Luz Zambrano Zaragoza

EN MEMORIA A:

MI querido abuelo el Sr. Miguel Domínguez Pichardo.

Hoy te cumplo la promesa que te hice en tu lecho de muerte.

Esta tesis es tuya.

Que Dios Todo poderoso te tenga en un lugar muy especial.

Por todo tu cariño, amor y la felicidad que me diste cuando

estuviste conmigo.... ! GRACIAS !

Tu recuerdo es uno de los mayores regalos que tengo en la vida.

DEDICATORIAS:

Dedico esta tesis :

A Dios,

por su infinito poder y bondad,

por la felicidad que le da a mi vida,

por la dicha de dejarme crecer en una hermosa familia,

por la oprotunidad que me brinda de tener un esposo adorable

y un hijo sin igual,

por la esperanza y alegría que me brinda por ser mejor cada día,

por estar presente en mi corazón en todo momento y por permitirme

acercarme a El cada vez que lo necesito.

A mi padre el Ing. Abel Cruz Sosa,

al que reconozco y agradezco su gran esfuerzo por brindarme una

buena educación que hoy esta dando frutos.

Te dedico este proyecto con la plena seguridad de que lo aceptas con

el mismo cariño que siempre me haz dejado sentir.

MI madre la Sra. Susana Domínguez Martínez,

a quien le debo mi vida y mi formación como mujer.

Por todos tus cuidados; entrega sin condición alguna y por tu apoyo en todas los proyectos que me he propuesto. ! GRACIAS !

Sin tu ayuda ninguno de mis sueños sería hoy una realidad.

Con todo mi amor y respeto ... esta realidad también es tuya.

A mi abuelita la Sra. Pina Martínez Campuzano,

mujer que siempre ha tenido palabras dulces y reconfortantes para mi espíritu.

Hoy querida GOOSIE se cumple un deseo más de los que le haz pedido a Dios se cumplieran.

Por tu paciencia, tenacidad y amor ! MUCHAS GRACIAS !

A mis hermanos Yadira, Abel y Luis Miguel,

a quienes les debo su ejemplo y mi deseo de superación.

Por todos los momentos tan bellos y especiales; por su hermandad y apoyo incondicional.

Por que este libro represente un elemento de firme competencia para ustedes el cual espero superen ampliamente.

A mi esposo el Ing. David J. Arellano Jiménez,
quien ha llenado mi vida de dulces y cálidos momentos.
Hoy cariño agradezco tu paciencia, tiempo y comprensión.
Esta tesis es mi tributo a tu amor.

A mi querido hijo David,
luz de mi vida y mi motivo para ser un mejor ser humano y profesionista cada día.
Porque eres mi esperanza y fuerza. NUNCA LO OLVIDES.

A mis queridos Profesores en la Licenciatura de quienes guardo un buen ejemplo
y recuerdo especialmente a mis profesores Patricia, Ma. Esther y Paco por creer en mi
como profesionista. Por su amistad y compañerismo... ! MUCHAS GRACIAS !.

A mis tíos y primos, pero muy especialmente a mi tía abuela, la Sra. Pilar Martínez
Campuzano por todo su cariño y esperanza para que yo terminara mis estudios; a mi tío
abuelo el Dr. Francisco Domínguez Pichardo por estar siempre cerca compartiendo ese
enlace entrañable que nos une y a mi tía abuela Elvira Martínez Campuzano por todos
tus cuidados cuando era pequeña y por tu eterna y entusiasta ayuda.

A mis amigos el Sr. Ignacio García Salgado y al Sr. Rodolfo Robles Gómez por su invaluable amistad y apoyo incondicional durante mi formación profesional. El haberlos conocido, es otro motivo para recordar a la Facultad con mucho cariño.

A mi querida amiga, la Lic. Adriana Vázquez Prieto, a quien le agradezco su amistad, cariño y perseverancia para que yo llegara a culminar esta etapa. Te quiero como una hermana.

A todos amigos y compañeros de la Licenciatura a quienes agradezco su compañía y afecto, mismos que hicieron memorables esos cinco años de estudios en la Facultad .

AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy sinceramente a la Universidad Nacional Autónoma de México el haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de bachillerato y Licenciatura en el Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel 5 Sur y en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, respectivamente.

A los profesores I.B.Q. Francisco Montiel Sosa, Q.F.B. Patricia Miranda Castro y Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda; por su valiosa asesoría en la realización de esta tesis.

A mis sinodales I.A. Alfredo Alvarez Cárdenas, I.A. Laura Margarita Cortázar Figueroa, Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz e I.B.Q. María de la Luz Zambrano Zaragoza; por sus consejos y comentarios para culminar este proyecto.

Al Lic. J. Ignacio G. García Salgado por su apoyo académico en la revisión del Capítulo 1.

Al Tec. Académico Rodolfo Robles Gómez por su apoyo en la elaboración de material fotográfico.

Al Especialista en programación Abel Cruz Domínguez por su apoyo en la elaboración de material gráfico.

Al Ing. David Arellano Jiménez por su apoyo en la impresión del documento original.

Índice

	pág.
Objetivos	1
Antecedentes	2
Capítulo 1. Metodología para la investigación documental	9
1.1 Introducción	10
1.2 Definición del plan de trabajo	11
1.2.1 Elección del tema	13
1.2.1.1 Acopio de bibliografía y hemerografía básica	
1.2.1.2 Delimitación del tema	
1.2.2 Elaboración del esquema de trabajo	14
1.2.3 Proposición de agenda de trabajo	16
1.2.3.1 Cuadro metodológico	
1.2.3.2 Cronograma de actividades	
1.2.3.3 Ejercicio	22
1.3 Fuentes de información	32
1.3.1 Tipos de fuentes de información	32
1.3.2 Organización de las fuentes de información	34
1.3.2.1 Fuentes de primera mano	
1.3.2.2 Fuentes de segunda mano	
1.3.2.3 Fuentes vivas	
1.3.2.4 Ejemplo de organización	35

1.3.2.5 Ejercicio	36
1.4 Búsqueda y localización de información documental	37
1.4.1 Búsqueda de fuentes bibliográficas	37
1.4.1.1 Colección general	
1.4.1.2 Colección de consulta	
1.4.1.3 Colección de publicaciones periódicas	
1.4.1.4 Colección de materiales especiales	
1.4.2 Localización de la información	38
1.4.2.1 Localización por catálogo bibliográfico	
1.4.2.1.1 Catálogos tradicionales	
1.4.2.1.2 Catálogos automatizados	
1.4.2.1.3 Catálogos en línea	
1.4.2.1.4 Ejemplo de búsqueda	
1.4.2.1.5 Ejercicios	44
1.4.2.2 Localización por kardex hemerográfico	45
1.4.2.2.1 Bases de datos	
1.4.2.2.2 Ejemplo de búsqueda	
1.4.2.2.3 Ejercicio	49
1.5 Recopilación de la información	50
1.5.1 Ficha bibliográfica	50
1.5.1.1 Contenido de la ficha bibliográfica	50
1.5.1.1.1 Nombre del autor	
1.5.1.1.2 Título del libro	
1.5.1.1.3 Traductor y prologuista	

1.5.1.1.4	Número de volumen y edición	
1.5.1.1.5	Lugar de impresión, editorial y año de publicación	
	(pie de imprenta)	52
1.5.1.1.6	Colección o serie	
1.5.1.1.7	Páginas	
1.5.1.1.8	Ubicación	
1.5.1.2	Ejemplos de fichas bibliográficas	54
1.5.1.3	Ejercicio	56
1.5.2	Ficha hemerográfica	56
1.5.2.1	Contenido de la ficha hemerográfica	57
1.5.2.1.1	Nombre del autor	
1.5.2.1.2	Título del artículo	
1.5.2.1.3	Título de la publicación	
1.5.2.1.4	Lugar de edición	
1.5.2.1.5	Datos de edición	
1.5.2.2	Ejemplos de fichas hemerográficas	58
1.5.2.3	Ejercicio	59
1.5.3	Ficha de trabajo	60
1.5.3.1	Contenido de la ficha de trabajo	60
1.5.3.1.1	Registro	
1.5.3.1.2	Categoría general	
1.5.3.1.3	Contenido o texto	
1.5.3.1.4	Comentarios	
1.5.3.2	Tipos de ficha de trabajo	62

1.5.3.2.1	Ficha de trabajo, de extracto o de digesto	
1.5.3.2.2	Ficha de resumen	
1.5.3.2.3	Ficha de datos aislados	
1.5.3.2.4	Ficha de cita textual	
1.5.3.3	Ejemplos de fichas de trabajo	63
1.5.3.4	Ejercicio	65
1.6	Presentación del material	66
1.6.1	El procesamiento de la información	66
1.6.1.1	Redacción preliminar	67
1.6.1.2	Aparato crítico	68
1.6.1.2.1	Notas de cita	
1.6.1.2.2	Notas de contenido	
1.6.1.2.3	Notas de referencia cruzada	
1.6.1.2.4	Inclusión del aparato crítico	
1.6.1.2.4.1	Dentro del texto	
1.6.1.2.4.2	Al pie de la página	
1.6.1.2.4.3	Al final de cada capítulo	
1.6.1.2.4.4	Al final del texto	
1.6.1.2.5	Recomendaciones	71
1.6.2	Elaboración del reporte por escrito	72
1.6.2.1	Portada	72
1.6.2.2	Dedicatorias	73
1.6.2.3	Prólogo	73
1.6.2.4	Introducción	74

1.6.2.5	Texto	74
1.6.2.6	Conclusiones	74
1.6.2.7	Elementos secundarios	75
1.6.2.7.1	Apéndice	
1.6.2.7.2	Índice	
1.6.2.7.3	Bibliografía	
Capítulo 2. Práctica demostrativa No. 1 .		
	Enzima modelo : ureasa	78
2.1	Generalidades sobre la enzima ureasa	79
2.1.1	Antecedentes	79
2.1.2	Nombres sinónimos	79
2.1.3	Clasificación	79
2.1.4	Sustrato	80
2.1.5	Reacción enzimática	80
2.1.6	Constante de Michaelis	81
2.1.7	Cofactores	81
2.1.8	Inhibidores	82
2.1.9	Peso molecular	82
2.1.10	Estructura	82
2.1.11	Pureza requerida	83
2.2	Actividades propuestas para el estudio de la enzima ureasa.	84
2.2.1	Diagrama metodológico	85
2.2.2	Extracción	86
2.2.2.1	Objetivo	86

2.2.2.1	Material	86
2.2.2.1	Procedimiento	87
2.2.3	Cuantificación	88
2.2.3.1	Objetivo	88
2.2.3.2	Material	88
2.2.3.3	Procedimiento	89
2.2.4	Purificación	90
2.2.4.1	Objetivo	90
2.2.4.2	Material por grupo	91
2.2.4.3	Procedimiento	92
2.2.5	Cinética enzimática	94
2.2.5.1	Objetivo particular	94
2.2.5.2	Material	94
2.2.5.3	Efecto del pH en la actividad enzimática	96
2.2.5.3.1	Objetivos específicos	
2.2.5.3.2	Procedimiento	
2.2.5.4	Efecto de la Temperatura en la actividad enzimática	97
2.2.5.4.1	Objetivos específicos	
2.2.5.4.2	Procedimiento	
2.2.5.5	Efecto del tiempo en la actividad enzimática	99
2.2.5.5.1	Objetivos específicos	
2.2.5.5.2	Procedimiento	
2.2.5.6	Efecto de la concentración de sustrato en la actividad enzimática	101
2.2.5.6.1	Objetivos específicos	

2.2.5.6.2 Procedimiento	
2.2.5.7 Efecto de la concentración de enzima en la actividad enzimática	102
2.2.5.7.1 Objetivos específicos	
2.2.5.7.2 Procedimiento	
2.2.5.8 Efecto de la concentración de inhibidor en la actividad enzimática	104
2.2.5.8.1 Objetivos específicos	
2.2.5.8.2 Procedimiento	
Capítulo 3. Práctica demostrativa No. 2	
Enzima modelo : Polifenol oxidasa	106
3.1 Generalidades de la enzima	107
3.1.1 Introducción	107
3.1.2 Nombres sinónimos	107
3.1.3 Número de clasificación	108
3.1.4 Sustratos	108
3.1.5 Reacciones enzimáticas involucradas	110
3.1.6 Sustancias de activación de la enzima	111
3.2 Actividades propuestas para el estudio de la enzima polifenol oxidasa	113
3.2.1 Diagrama metodológico	114
3.2.2 Selección de fuentes de obtención	115
3.2.2.1 Objetivo particular	115
3.2.2.2 Material	115
3.2.2.3 Procedimiento	116
3.2.3 Extracción	117
3.2.3.1 Objetivo particular	117

3.2.3.2	Material	117
3.2.3.3	Etapa 1. Obtención de polvo cetónico	119
3.2.3.3.1	Objetivo específico	
3.2.3.3.2	Procedimiento	
3.2.3.4	Etapa 2. Solución y activación de la enzima PPO	120
3.2.3.4.1	Objetivo específico	
3.2.3.4.2	Procedimiento	
3.2.4	Cuantificación	121
3.2.4.1	Objetivo particular	121
3.2.4.2	Material	121
3.2.4.3	Procedimiento	122
3.2.5	Purificación	124
3.2.5.1	Objetivo particular	124
3.2.5.2	Material por grupo	124
3.2.5.3	Procedimiento	125
3.2.6	Cinética enzimática	127
3.2.6.1	Objetivo particular	127
3.2.6.2	Material	127
3.2.6.3	Efecto del pH en la actividad enzimática	129
3.2.6.3.1	Objetivos específicos	
3.2.6.3.2	Procedimiento	
3.2.6.4	Efecto de la Temperatura en la actividad enzimática	130
3.2.6.4.1	Objetivos específicos	
3.2.6.4.2	Procedimiento	

3.2.6.5 Efecto del tiempo en la actividad enzimática	132
3.2.6.5.1 Objetivos específicos	
3.2.6.5.2 Procedimiento	
3.2.6.6 Efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de reacción	134
3.2.6.6.1 Objetivos específicos	
3.2.6.6.2 Procedimiento	
3.2.6.7 Efecto de la concentración de la enzima en la velocidad de reacción	136
3.2.6.7.1 Objetivos específicos	
3.2.6.7.2 Procedimiento	
3.2.6.8 Efecto de la concentración de un inhibidor en la velocidad de reacción	137
3.2.6.8.1 Objetivos específicos	
3.2.6.8.2 Procedimiento	
4. Prácticas demostrativas futuras	140
4.1 Propuestas a futuro utilizando los nuevos recursos	141
4.1.1 Optimización de las etapas de extracción y purificación de una enzima	141
4.1.2 Cinética de desnaturalización y evaluación del tiempo de vida media de una enzima	142
4.1.3 PCR : Técnica que puede ser utilizada en la industria alimentaria	145
4.2 Descripción y uso de material audiovisual para el apoyo en la asignatura.	147
Conclusiones	149
Recomendaciones	151

Bibliografía	152
Bibliografía consultada	153
Bibliografía recomendada	156
Anexos	163
A.1 Metodología de cálculo para el tratamiento de los resultados para la enzima ureasa	164
A.2 Manual de operación del fotocolorímetro Klett Summerson	167
A.2.1 Introducción	167
A.2.2 Componentes del fotocolorímetro Klett Summerson	168
A.2.3 Instrucciones de manejo del fotocolorímetro Kett Summerson	169
A.3 Manual de operación del espectrofotómetro Spectronic 21	173
A.3.1 Introducción	173
A.3.2 Componentes del espectrofotómetro	176
A.3.3 Instrucciones de operación	177
A.4 Listado de reactivos empleados para las prácticas demostrativas con la enzima ureasa (por equipo)	179
B.1 Listado de reactivos empleados para las prácticas demostrativas con la enzima polifenol oxidasa (por equipo)	180
C.1 Lista de equipos de tecnología reciente para el estudio de la etapa de extracción y purificación de enzimas.	181
C.2 Lista de equipos de tecnología reciente para el estudio de la cinética y desnaturalización térmica de enzimas	182
C.3 Lista de equipo y material complementario necesario para el desarrollo de las prácticas demostrativas	183

C.4 Lista de equipo de tecnología reciente para el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa	184
C.5 Lista de equipo audiovisual y de cómputo para el apoyo en la asignatura	185

OBJETIVO GENERAL

Elaborar una guía de la metodología de investigación documental con la que se apoya a los alumnos en la elaboración de sus proyectos y de las prácticas demostrativas que se llevan a cabo como apoyo al marco teórico de enseñanza de la asignatura del Paquete Terminal de Enzimas de Uso Alimentario para que el alumno cuente con un material didáctico que facilite su formación profesional.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Presentar la estructura bajo la cual está organizada la asignatura para que el alumno se familiarice con el sistema de trabajo del Paquete Terminal de Enzimas de Uso Alimentario.
- 2) Desarrollar una guía metodológica para la realización de una investigación documental.
- 3) Desarrollar las prácticas demostrativas en las cuales se revisen procedimientos de extracción, purificación, cuantificación y cinética enzimática para la caracterización de dos enzimas modelo : la ureasa y la polifenol oxidasa
- 4) Describir posibles alternativas de uso para los nuevos equipos en la planeación de las prácticas demostrativas.
- 5) Describir los nuevos equipos y material didáctico con que cuenta la asignatura para su uso por los alumnos en la elaboración de sus proyectos teóricos con enzimas; orientados a su aplicación en la Industria alimentaria.

ANTECEDENTES.

La Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; ofrece la Licenciatura de Ingeniería en Alimentos la cual cuenta un plan de estudios, vigente desde 1977; planeado para cubrirse en 9 semestres y se conforma de 55 asignaturas de las cuales 45 son de carácter teórico y 9 de enseñanza experimental; representando el 100% de la formación integral del alumno.

La asignatura teórica denominada "Paquete Terminal", podría ser considerada como una alternativa específica de orientación profesional que se cursa en el último semestre de la carrera.

Existen 5 opciones de paquetes terminales a elegir asentadas en el plan de estudios :

- Refrigeración y Congelación.
- Frutas y Hortalizas.
- Enzimas de Uso Alimentario.
- Tecnología Adecuada.
- Propiedades fisicoquímicas de los alimentos.

Entre estas opciones, el Paquete Terminal de Enzimas de Uso Alimentario se encuentra disponible a partir del segundo periodo de 1992 y tiene como objetivo, según lo establece el plan de estudios de la carrera el :

"Proporcionar los conceptos básicos de la enzimología, las técnicas de extracción y purificación y las aplicaciones de enzimas en las diferentes industrias alimentarias".

El modelo de enseñanza en la asignatura del Paquete Terminal de Enzimas de Uso Alimentario desde su apertura; es de carácter teórico y se refuerza con algunas actividades demostrativas.

El marco teórico proporciona los conceptos básicos, para que el alumno conozca y aprenda las generalidades del estudio de las enzimas y estime la importancia de la biotecnología enzimática, para su aplicación en la industria alimentaria; mientras que las actividades demostrativas, cumplen el propósito de reforzar el entendimiento y manejo de los conceptos adquiridos en el marco teórico. Bajo este modelo, se cumple el objetivo asentado en el plan de estudios sobre la formación terminal del alumno de Ingeniería en alimentos orientado a la enzimología.

En detalle, las actividades demostrativas de apoyo al aspecto teórico de la asignatura comprenden:

- prácticas demostrativas.
- diseño de proyectos y
- visitas a centros de investigación

Las prácticas demostrativas, son actividades elaboradas para que el alumno se interese en la enzimología, a través de la caracterización de dos enzimas modelo que son la Ureasa y la Polifenol oxidasa; de las cuales ya se cuenta con metodologías

estandarizadas y comprobadas. Las prácticas demostrativas se llevan a cabo con el apoyo de la Sección de Bioquímica y Farmacología Humana, la cual facilita el espacio físico y brinda los recursos necesarios para su desarrollo.

Estas prácticas demostrativas permiten que el alumno desarrolle habilidad en el manejo de las enzimas así como en la aplicación de técnicas, material y equipo de investigación básico para su estudio. Con estas actividades, se refuerzan los conceptos revisados teóricamente relativos a los temas de extracción, purificación, cuantificación y cinética enzimática principalmente.

Previo al desarrollo de las prácticas demostrativas, se les solicita a los alumnos, organizados en dos grandes grupos de trabajo, realicen una investigación documental breve de algunos aspectos elementales sobre ambas enzimas modelo; entre ellos :

- antecedentes
- condiciones óptimas de actividad y factores que la alteran
- metodologías específicas reportadas experimentalmente para su caracterización
- aplicaciones de ambas enzimas en la industria
- Uso de las enzimas (p. ej. en reactores o inmovilizadas).

Esta información es entregada en un informe escrito y presentada para su discusión y análisis en seminarios donde el alumno conoce teóricamente a la Ureasa y la Polifenol oxidasa. Relativo a este trabajo de investigación previo, el alumno es asesorado con la metodología para que realice la investigación documental y elabore su informe reforzando su habilidad en el manejo de información bibliográfica y hemerográfica, así como su

adecuada presentación en un reporte escrito. Esta investigación documental sirve como ejercicio preliminar para que el alumno realice sin contratiempos la actividad demostrativa de diseño, la cual se explica posteriormente.

Las prácticas demostrativas se desarrollan en equipos de trabajo, siendo el alumno evaluado en forma individual.

El diseño de proyectos de investigación, es una actividad teórica con posibilidad de llevarse a cabo experimentalmente al finalizar el semestre; desarrollada en forma individual y tiene la finalidad de que el alumno aplique los conocimientos teóricos adquiridos, en el planteamiento de un proyecto; en el cual esté o pueda estar involucrado el uso de enzimas para la mejora de un proceso relativo a la industria alimentaria. Para el desarrollo de estos proyectos, se le solicita al alumno que lleve a cabo una investigación documental amplia del tema; así como el planteamiento de un diseño experimental factible de desarrollarse en la universidad.

Estos proyectos se realizan en el transcurso del semestre y reciben asesoría continua para su elaboración, apoyándolos entre otros aspectos con la metodología necesaria para que lleven a cabo una investigación documental ágil y organizada, dando oportunidad a que cuenten con el mayor tiempo posible para el planteamiento del diseño experimental. Al concluir el semestre, el alumno entrega su proyecto por escrito y lo expone frente al grupo en una mesa redonda.

Con el desarrollo de esta actividad el alumno del Paquete Terminal cuenta con un tema que puede ser retomado como alternativa de titulación a nivel de licenciatura, y que puede continuarse inmediatamente al finalizar el curso.

Las visitas permiten que el alumno observe algunos proyectos de investigación que se desarrollan en el país relacionados a la enzimología, reforzando así sus conocimientos teóricos al tener que aplicarlos para la revisión de los proyectos. Estas visitas se realizan a dos instituciones que son :

- el Instituto de Biotecnología de la UNAM ubicado en Cuernavaca, Morelos
- el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN en Zacatenco.

Ambas visitas se realizan al final del semestre, siendo evaluada esta actividad a través de la entrega de un reporte escrito en equipos de trabajo y complementada con una mesa redonda en donde se revisa y analiza en grupo, los procesos y equipo involucrado en los proyectos de investigación observados y se plantea algunas mejoras para tales procesos.

El conjunto de estas actividades han brindado a la asignatura un ambiente de aprendizaje muy atractivo para el alumnos el cual se ha reflejado en el incremento de la población que la cursa. Sin embargo, es una necesidad para los asesores de la asignatura el planear nuevas actividades demostrativas que integren en su totalidad los conceptos que se revisan en el programa de estudio y que además sean alternativas para que el alumno lleve a cabo su titulación a nivel Licenciatura incrementando así su eficiencia terminal la cual ya ha dado frutos.

Con esta visión, los asesores de la asignatura, a través del Programa de Apoyo sobre Proyectos Institucionales de Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) realizaron la adquisición de recursos como equipos de investigación; equipos de cómputo y audiovisual y bibliografía especializada que se utilicen para ofrecer :

- la mejora de las condiciones de extracción, purificación y caracterización que permitan estudiar enzimas con aplicación en la industria alimentaria que puedan obtenerse de cualquier tipo de fuente.
- el desarrollo de nuevas prácticas demostrativas a futuro que refuercen los conceptos sobre inmovilización y diseño de reactores.
- Apoyo bibliográfico sobre algunos temas especiales revisados en el programa de estudio de la asignatura.
- la mejora en la elaboración de los proyectos de investigación.
- la mejora en la exposición de los proyectos de investigación.

Otro elemento que se considera como necesario para la mejora de la enseñanza en la asignatura es la generación de material de apoyo que sirva de referencia a los alumnos sobre algunos aspectos relativos al Paquete Terminal. Esta guía es uno de ellos y contiene los siguientes rubros:

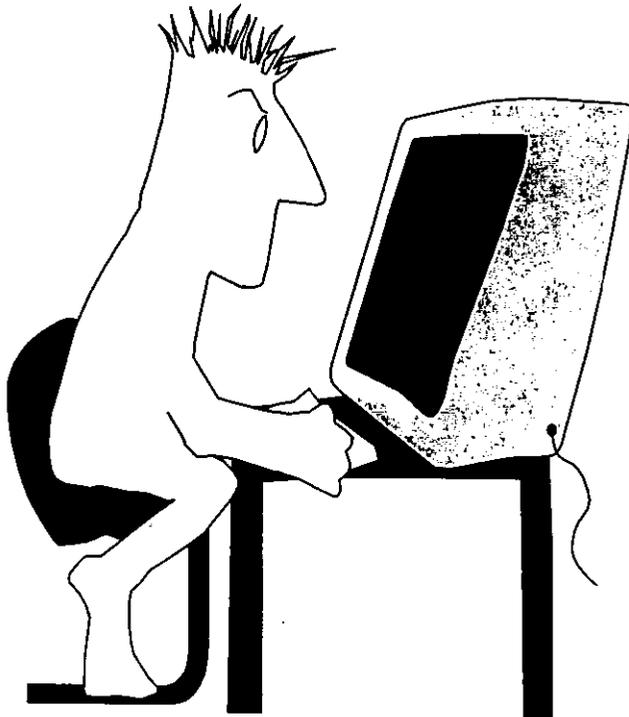
El Capítulo 1 presenta la metodología que se brinda a los alumnos para la realización de la investigación documental.

El Capítulo 2 y 3 proporcionan la metodología y recursos necesarios para el desarrollo de las dos prácticas demostrativas que se tienen estandarizadas para la caracterización de las enzimas modelo.

El Capítulo 4 describe brevemente futuras prácticas demostrativas que se planean para reforzar los temas que no se cubren con las otras actividades como lo es la inmovilización de enzimas, diseño de electrodos biológicos y reactores; las cuales contemplan el uso de los equipos recientemente adquiridos. También se describe la aplicación que se le dará a algunos equipos de apoyo a la asignatura como son las computadoras, equipo audiovisual y bibliografía; obtenidos a través del PAPIME.

Capítulo 1.

METODOLOGIA
PARA LA
INVESTIGACION
DOCUMENTAL.



1.1 Introducción.

En cualquier disciplina, es requisito indispensable la investigación para su desarrollo y así adquirir conocimientos y enriquecer la formación intelectual.

La investigación se puede definir como la serie de etapas que dan respuesta lógica a una pregunta específica, requiriéndose para ello una metodología que permite obtener información que conteste esta pregunta formulada.

Desafortunadamente, en muchas ocasiones, los alumnos no cuentan con una metodología y mucho menos, con las herramientas necesarias para la elaboración eficiente de un trabajo de investigación de tipo documental.

Este capítulo presenta una guía metodológica para el desarrollo de la investigación documental que se requiere en la actividad demostrativa de elaboración de proyectos y de las prácticas demostrativas para el estudio de las enzimas modelo.

1.2 Definición del plan de trabajo

El plan de trabajo es una herramienta muy útil y se considera como una forma para controlar el procedimiento de la investigación.

El plan de trabajo o diseño de investigación equivale al planteamiento del problema; este diseño en el transcurso de la investigación se enriquecerá o modificará y dará origen a un trabajo escrito serio, formal y bien documentado¹.

El diseño de investigación tiene los siguientes metas:

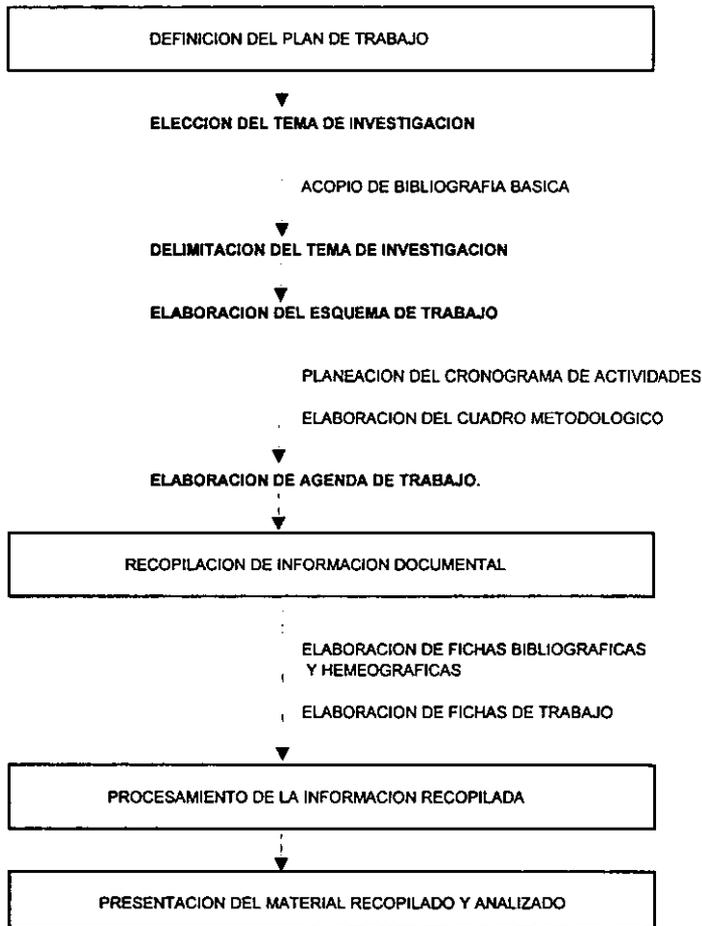
1. Determinar los fines del trabajo.
2. Señalar las diferentes partes del problema a través del planteamiento claro de ideas que se tengan acerca de él.
3. Seleccionar el procedimiento adecuado para realizar la investigación.
4. Prever el tiempo y el orden en que se desarrollarán las diferentes etapas del estudio.

Al momento en que se genera un plan de trabajo, éste se podrá presentar a la aprobación de la Institución o de la persona responsable del proyecto, que en nuestro caso particular será el profesor de la asignatura.

De forma general se puede considerar que el diseño de investigación está basado en las siguientes etapas. Ver cuadro 1.1.

¹ GARZA MERCADO, cit pos, Guillermina Baena Paz. Instrumentos de Investigación ..., p. 13.

CUADRO 1.1 ETAPAS DE UN PROYECTO DE INVESTIGACION DOCUMENTAL.



1.2.1 Elección del tema.

Cuando se elige un tema (generalmente propuesto por el asesor de la asignatura) es conveniente que el alumno tenga en mente que el desarrollo del mismo dependerá de su interés personal y de la importancia que tenga dentro de un contexto académico. Para ello es útil y benéfico, en un principio, que el alumno o investigador se familiarice con el tema mediante la búsqueda de información relacionada.

1.2.1.1 Acopio de bibliografía y hemerografía básica

Un acopio y revisión rápida de las fuentes de información o referencias bibliográficas permitirá :

1. Evitar trabajos repetitivos.
2. Orientar la selección de la bibliografía que sirva de base a la investigación.
3. Facilitar la delimitación del tema.

Durante el acopio de éste material básico, se recomienda la elaboración de fichas bibliográficas y hemerográficas que sirvan para:

1. Localizar con facilidad la obra que identifican.
2. Hacer notas de texto en la etapa de que se hace referencia.
3. Elaborar la bibliografía de un trabajo.
4. Integrar un fichero con los datos de todo el material informativo con que el investigador

cuenta.

1.2.1.2 Delimitación del tema.

Cuando se ha cumplido con la etapa anterior se procede a la delimitación del tema donde es conveniente tomar en cuenta:

1. El objetivo que se desea lograr con el trabajo.
2. El nivel al que se realizará la investigación ya sea demostrativo, explicativo o predictivo.
3. El tiempo disponible para realizar el trabajo.
4. El material bibliográfico y hemerográfico disponible.
5. La ubicación en el tiempo y lugar del objeto de trabajo.

1.2.2 Elaboración del esquema de trabajo.

El esquema de trabajo permite manejar una idea clara u ordenada de las partes probables en que habrá de dividirse el trabajo o estudio y será semejante a un índice de contenido preliminar².

El esquema inicial se elabora después de haber realizado una primera lectura informativa de los materiales disponibles. Es de gran utilidad porque:

1. Permite determinar los objetos reales de estudio.

² Laura Cázares Hernández, *et al.* . Técnicas actuales de investigación ... , p. 69.

2. Tener una guía permanente para recoger la información buscada sin salirse del tema propuesto.
3. Suministra los elementos básicos que servirán para redactar posteriormente el índice del trabajo terminado.
4. Se modifica conforme avanza la investigación.

La presentación del esquema puede realizarse por dos tipos de sistemas; ambos indican las relaciones de coordinación y dependencia entre las diversas partes del conjunto de elementos que los conforman. Uno se representa en base a números romanos, letras mayúsculas, números arábigos y letras minúsculas conocido como SISTEMA CONVENCIONAL.^{3,4}

Un ejemplo de este tipo de Esquema es:

III. PROYECTO FENOLASA

A. ASPECTOS GENERALES DE LA ENZIMA

B. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. EXTRACCION

- a. Objetivo
- b. Material
- c. Procedimiento.

2. CUANTIFICACION

- a. Objetivo
- b. Material
- c. Procedimiento.

³ idem. p. 59 - 61.

⁴ Guillermina Baena Paz. Instrumentos de investigación... , p. 24 - 26.

El otro tipo de clasificación se le denomina decimal y es el que permite una delimitación mucho más amplia, sólo hay que tener cuidado en aplicar bien la jerarquía. Un ejemplo de ESQUEMA DECIMAL es:

1. INFORMACION DOCUMENTAL

1.1 OBJETIVO

1.2 FUENTES DE INFORMACION

1.2.1 TIPOS DE FUENTES DE INFORMACION

1.2.2 ORGANIZACION DE LAS FUENTES DE INFORMACION

1.2.2.1 Fuentes de primera mano

1.2.2.2 Fuentes de segunda mano

1.2.2.3 Fuentes vivas

En ambos ejemplos debemos tener lógica y recordar que todo entero que se divide **NO PUEDE QUEDAR COMO ENTERO**, este debe fragmentarse en dos o más partes.

1.2.3 Proposición de agenda de trabajo.

La agenda de trabajo nos permite visualizar y precisar las etapas o actividades requeridas para efectuar la investigación, así como el lapso en el que se cubrirán cada una. Puede precisarse cada actividad por día e incluso el número de horas que se le dedicará diariamente o por mes o semana. La agenda será indicativo de los avances y retrasos que se desarrollen en el cumplimiento de cada etapa durante la investigación. La agenda puede ser planteada en base a un cuadro metodológico o a través de cronogramas de actividades como se muestra en los apartados siguientes.

1.2.3.1 Cuadro metodológico.

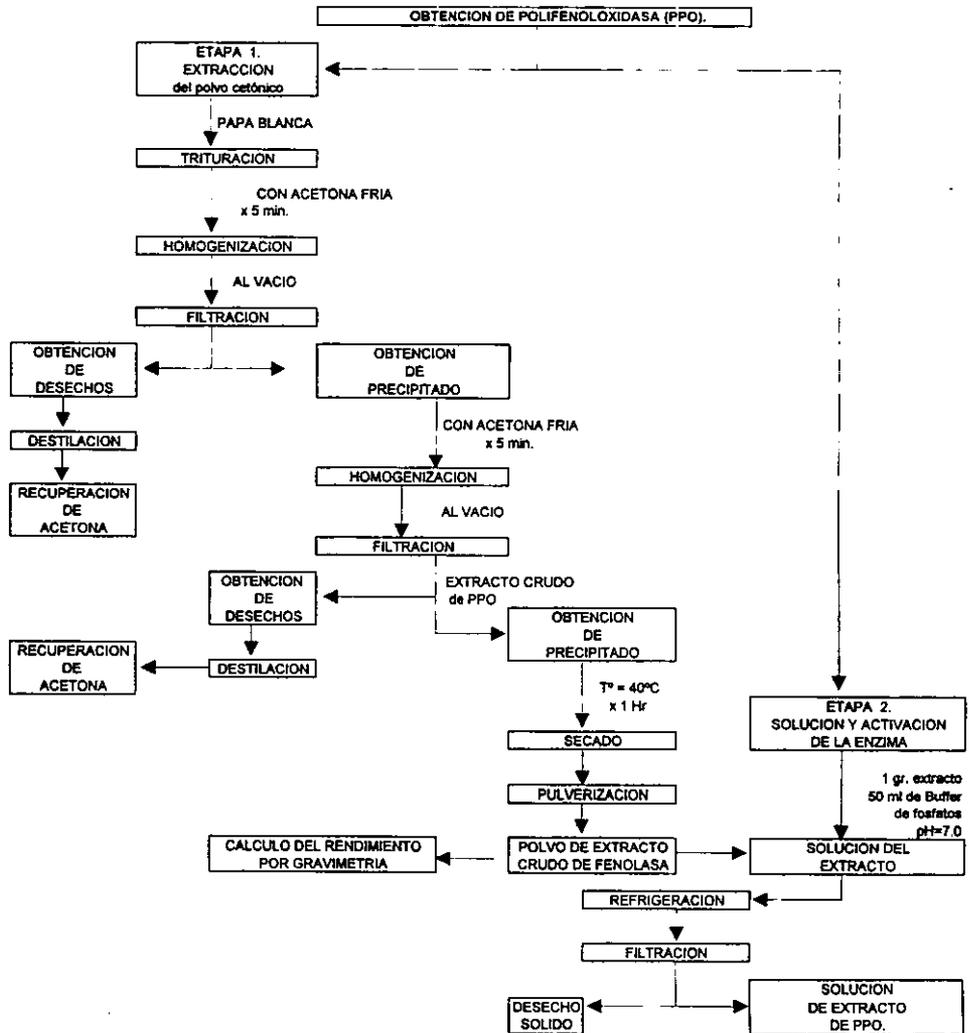
Un cuadro metodológico presenta la secuencia con la cual se lleva a cabo una actividad; a continuación se presenta un ejemplo para la elaboración de un cuadro metodológico que detalla la obtención del extracto crudo de polifenol oxidasa. Ver cuadro 1.2

1.2.3.2 Cronograma de actividades

Un cronograma de actividades concentra como su nombre lo dice, las actividades a desarrollar en cualquier estudio, y le proporciona una secuencia lógica y ordenada. Existen muchas formas de presentar un cronograma; como ejemplos se muestra uno en forma de tabla y dos en forma de esquema.

Los tres ejemplos presentan las actividades a desarrollar en las prácticas demostrativas del Paquete Terminal de Enzimas de Uso Alimentario.

CUADRO 1. 2 EJEMPLIFICACION DE UN CUADRO METODOLOGICO



CUADRO 1.3 EJEMPLO DE CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES EN FORMATO DE TABLA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
PAQUETE TERMINAL DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

PERIODO: 98-I

HOJA 2 de 2

ASESOR: _____

FECHA		ACTIVIDAD
DIA	MES	
8	DICIEMBRE	PRACTICA DEMOSTRATIVA No. 2 . POLIFENOL OXIDASA SEMINARIO DE IFORMACION.
16	DICIEMBRE	PRACTICA DEMOSTRATIVA : 2.1 EXTRACCION 2.2 CUANTIFICACION
12	ENERO	PRACTICA DEMOSTRATIVA : 2.3 PURIFICACION 2.4 MEDICION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA 2.4.1 EFECTO DEL pH EN LA VELOCIDAD DE REACCION 2.4.2 EFECTO DE TEMPERATURA EN VELOCIDAD DE REACCION
19	ENERO	PRACTICA DEMOSTRATIVA : 2.4 MEDICION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA 2.4.3 EFECTO DEL TIEMPO EN LA VELOCIDAD DE REACCION 2.4.4 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA EN LA VELOCIDAD DE REACCION.
26	ENERO	PRACTICA DEMOSTRATIVA : 2.4.5 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO EN LA VELOCIDAD DE REACCION 2.4.6 EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL INHIBIDOR EN LA VELOCIDAD DE REACCION
2º	FEBRERO	SEMINARIO DE RESULTADOS TEMA 2. FENOLASA
9º	FEBRERO	EXAMEN FINAL SOBRE LAS PRACTICAS DEMOSTRATIVAS
16	FEBRERO	ENTREGA DE CALIFICACION DE LAS PRACTICAS DEMOSTRATIVAS.

CUADRO 1.4 EJEMPLO DE CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES EN FORMATO DE ESQUEMA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN.
 PAQUETE TERMINAL DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO
 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES SEMESTRAL

SEMESTRE : 97 - II.

ASESOR: _____

SEMANA	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO
1			LUNES 1 P. DEMOSTRATIVA No. 1 UREASA SEMINARIO DE RESULTADOS		
2		LUNES 3 1.1 EXTRACCION 1.2 CUANTIFICACION	LUNES 8 P. DEMOSTRATIVA No. 2 FENOLASA SEMINARIO DE INFORMACION		LUNES 2 P. DEMOSTRATIVA No. 2 FENOLASA SEMINARIO DE RESULTADOS
3		LUNES 10 1.3 PURIFICACION 1.4 ACT. ENZIMATICA	LUNES 15 2.1 EXTRACCION Y ACTIVACION 2.2 CUANTIFICACION	LUNES 12 2.3 PURIFICACION 2.4 ACTIVIDAD ENZIMATICA	LUNES 9 EXAMEN FINAL
4	LUNES 20 PRESENTACION DE LAS PRACTICAS DEMOSTRATIVAS DEL P. T. ENZIMAS	LUNES 17 1.4 ACT. ENZIMATICA		LUNES 19 2.4 ACTIVIDAD ENZIMATICA	LUNES 16 ENTREGA DE CALIFICACIONES DEL
5	LUNES 27	LUNES 24 1.4 ACT. ENZIMATICA		LUNES 26 2.4 ACTIVIDAD ENZIMATICA	

CUADRO 1.5 EJEMPLO DE CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES EN FORMATO DE ESQUEMA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN.
 PAQUETE TERMINAL DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO
 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES MENSUAL

MES : NOVIEMBRE.

PERIODO : 97 - II.

ASESOR: _____

LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES
3	4	5	6	7
PRACTICA DEMOSTRATIVA No. 1 UREASA 1.1 EXTRACCION 1.2 CUANTIFICACION				
10	11	12	13	14
1.3 PURIFICACION 1.4 MED. ACT. ENZ. 1.4.1. pH vs. Vel. reac. 1.4.2. T° vs. Vel. reac.				
17	18	19	20	21
1.4 MED. ACT. ENZ. 1.4.3. Tiempo vs. Vel. reac. 1.4.4. [E] vs. Vel. reac.				
24	25	26	27	28
1.4 MED. ACT. ENZ. 1.4.5. [S] vs. Vel. reac. 1.4.6. [INH] vs. Vel. reac.				

1.2.3.3 Ejercicio.

1. Desarrolle el plan de trabajo que requerirá para la elaboración de su proyecto de investigación del tema especificado por su asesor asignado.
2. Elabore el cuadro metodológico relacionado a su proyecto de investigación. No es necesario que lo detalle tan ampliamente.
3. Elabore el cronograma de actividades utilizando los formatos de las páginas 23 a la 26 que se incluyen a continuación para el planteamiento de las actividades para el desarrollo de las prácticas demostrativas.
4. Utilice los cuadros de actividades mensuales de las páginas 27 a la 31, para asentar los días y horas de trabajo que dedicará durante el semestre para la elaboración de su proyecto de investigación determinado por su asesor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
PAQUETE TERMINAL DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

PERIODO: _____

HOJA 2 DE 3

ASESOR: _____

		ACTIVIDAD
DIA	MES	

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN.
PAQUETE TERMINAL DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES SEMESTRAL

SEMESTRE: _____

ASESOR: _____

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN.
PAQUETE TERMINAL DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES MENSUAL.

MES : _____

PERIODO : _____

ASESOR: _____

HOJA 1 DE 5

LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN.
PAQUETE TERMINAL DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES MENSUAL.

MES : _____

PERIODO : _____

ASESOR: _____

HOJA 2 DE 5

LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTTLAN.
PAQUETE TERMINAL DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES MENSUAL

MES : _____

PERIODO : _____

ASESOR: _____

HOJA 3 DE 5

LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN.
PAQUETE TERMINAL DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES MENSUAL.

MES : _____

PERIODO : _____

ASESOR: _____

HOJA 4 DE 5

LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN.
PAQUETE TERMINAL DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES MENSUAL

MES : _____

PERIODO : _____

ASESOR: _____

HOJA 5 DE 5

LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES

1.3 Fuentes de información.

1.3.1 Tipos de fuentes de información.

Dentro de la investigación, siempre es necesario adquirir información relacionada al tema por trabajar. Esta información se obtiene a través del uso de dos técnicas de investigación:

- Documental

- De campo

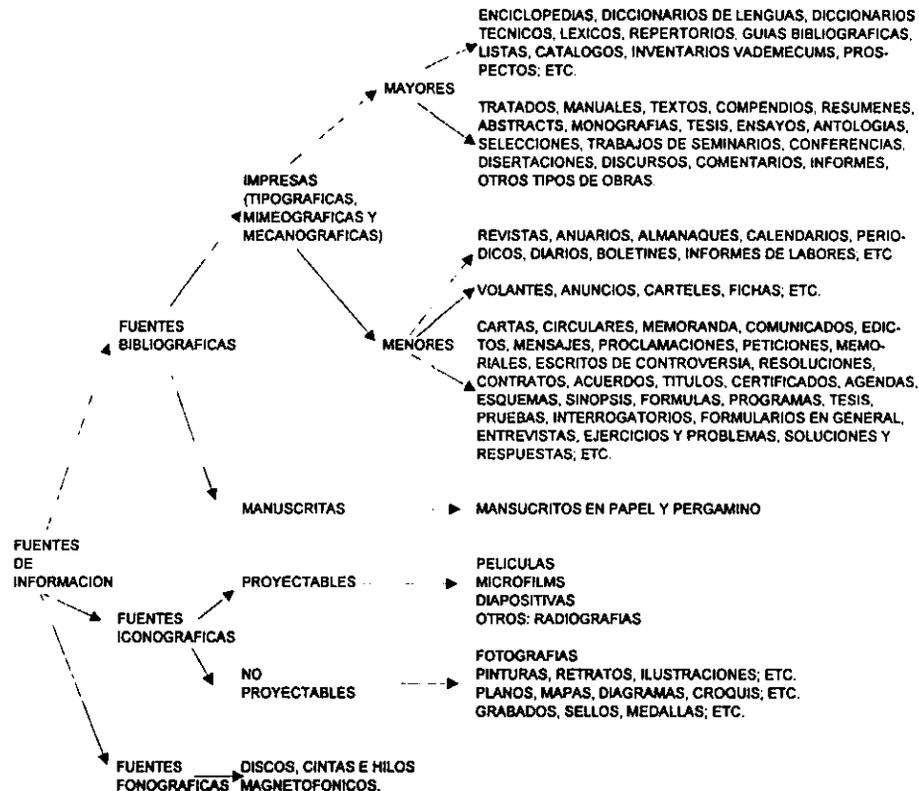
Refiriéndonos específicamente a las técnicas de investigación documental, estas utilizan las fuentes de información gráficas que, según el metodólogo Huascar Taborga : ⁵

" ... traducen el pensamiento mediante algunos signos convencionales registrados en forma escrita, ya sea con palabras o imágenes o bien, en forma sonora. Se subdividen en bibliográficas, iconográficas y fonográficas ". Ver Cuadro 1.6 ⁶

⁵ Huascar Taborga, cit. pos. , Ernesto de la Torre Villar y Ramiro Navarro de Anda. Metodología de la investigación... , p. 17

⁶ Ernesto de la Torre Villar y Ramiro Navarro de Anda, op.cit. , p. 18

CUADRO 1.6 ESQUEMA DE FUENTES DE INFORMACION



FUENTE: Ernesto de la Torre Villar y Ramiro Navarro de Anda, Metodología de la investigación, bibliográfica, archivística y documental, p. 18.

1.3.2 Organización de las fuentes de información

Cuando se selecciona un tema de investigación, generalmente es un buen recurso el llevar a cabo la recopilación de la literatura relacionada , con el fin de delimitar el alcance del proyecto.

Al definir un esquema de trabajo o diseño, basado inicialmente en las necesidades de investigación del tema seleccionado, este debe contemplar como una parte fundamental, la revisión y señalamiento de fuentes de información preliminares y posteriormente las definitivas.

Una primera recopilación y revisión rápida de la literatura, ayudará a ubicar las fuentes de las que partirá el trabajo.

Cuando hay pocas fuentes de información como punto de partida, se escribirán en orden alfabético, por el apellido del autor.

En el caso de existir muchas fuentes, lo más conveniente es intentar un balance de las mismas. Se escribirán subdividiéndolas en tres apartados:

1.3.2.1 Fuentes de primera mano

Las fuentes de primera mano se pueden definir como aquel material impreso, iconográfico y fonográfico de actualidad y que es específico o que está muy relacionado con el tema de investigación. Generalmente se obtiene de instituciones e investigadores

que estén llevando a cabo estudios sobre el tema elegido, difundido fundamentalmente a través de publicaciones periódicas.

1.3.2.2 Fuentes de segunda mano

Las fuentes de segunda mano son aquel material de carácter bibliográfico impreso, principalmente libros. La calidad de la información generalmente no es muy actualizada.

1.3.2.3 Fuentes vivas

Las fuentes vivas se refieren a otros testimonios no escritos, como son entrevistas o encuestas que son fundamentales en algunos trabajos de investigación de campo.

1.3.2.4 Ejemplo de organización

Refiriéndonos estrictamente a las referencias de primera y segunda mano, estas se pueden subdividir a su vez en generales y específicas sobre el tema y todavía se puede efectuar una tercera división por apartados donde se señale el tipo de fuente. Por ejemplo, podemos clasificar como:

-Fuentes de primera mano:

- Generales

- Documentos escritos, volantes, circulares, manifiestos

- Películas, programas de radio, discos

- Publicaciones periódicas
- Particulares
 - Publicaciones periódicas
 - Documentos del tema referido
 - Testimonios audiovisuales sobre el tema
- Fuentes de segunda mano:
 - Generales
 - Libros
 - Publicaciones periódicas
 - Particulares
 - Libros
 - Artículos
 - Tesis
 - Folletos

Este manual presenta al final, como ejemplo, las fuentes de información recopiladas las cuales sirvieron para la elaboración de este documento.

1.3.2.5 Ejercicio

Trate usted de definir conforme al ejemplo; la organización del material de apoyo a su proyecto de investigación según se apeguen al tipo de fuente de información.

1.4 Búsqueda y localización de información documental.

1.4.1 Búsqueda de fuentes bibliográficas ⁷

Inmediatamente después de generar un esquema de trabajo, la búsqueda de información es la siguiente etapa, por lo general, dentro de un modelo de investigación.

Es en esta etapa donde la Universidad apoya al estudiante e investigador a través de un sistema bibliotecario muy amplio, mismo que se distribuye en unidades localizadas en institutos, facultades, escuelas y otras dependencias representando un importante medio de difusión cultural. Las diferentes bibliotecas que conforman el sistema, cuentan con material clasificado como "colecciones bibliográficas", organizadas como sigue:

1.4.1.1 Colección general

Contiene bibliografías que apoyan diferentes planes de estudio y disciplinas

1.4.1.2 Colección de consulta

Con material que proporciona información rápida en diferentes áreas; entre ellos se encuentran: diccionarios, enciclopedias, índices, almanaques; etc.

⁷ José Luis Almanza Morales y Minerva del Angel Santillán . Ven y utiliza los recursos ... , p. 9 - 24.

1.4.1.3 Colección de publicaciones periódicas

Formada por periódicos, boletines, revistas, anuarios, informes y material cuya edición puede ser semanal, quincenal, trimestral, anual o en otros intervalos. La información que brinda es más actualizada que la de la colección general.

En la FESC, en Campo 1, ésta colección se encuentra en la Hemeroteca localizada en la planta baja del edificio de posgrado.

1.4.1.4 Colección de materiales especiales

Está integrada por todo material no bibliográfico, tal como diapositivas, discos, audiocassettes, videocassettes, películas, mapas, carteles, globos terráqueos, modelos, juegos didácticos; etc.

1.4.2 Localización de la información

Dependiendo de las características de cada colección, la biblioteca las ofrece al usuario por medio de servicios como son: el préstamo interno, externo (a domicilio), interbibliotecario, de consulta, fotocopiado, etc. Para una adecuada y eficaz localización de la información contenida en las colecciones, existen dos instrumentos básicos de apoyo para su búsqueda. En el caso de las colecciones general y de consulta, el catálogo es un elemento fundamental; mientras que en la colección de publicaciones periódicas, el kardex funge como elemento básico.

Ambos describen las características de las fuentes de información y la organizan por medio de una clasificación.

1.4.2.1 Localización por catálogo bibliográfico.

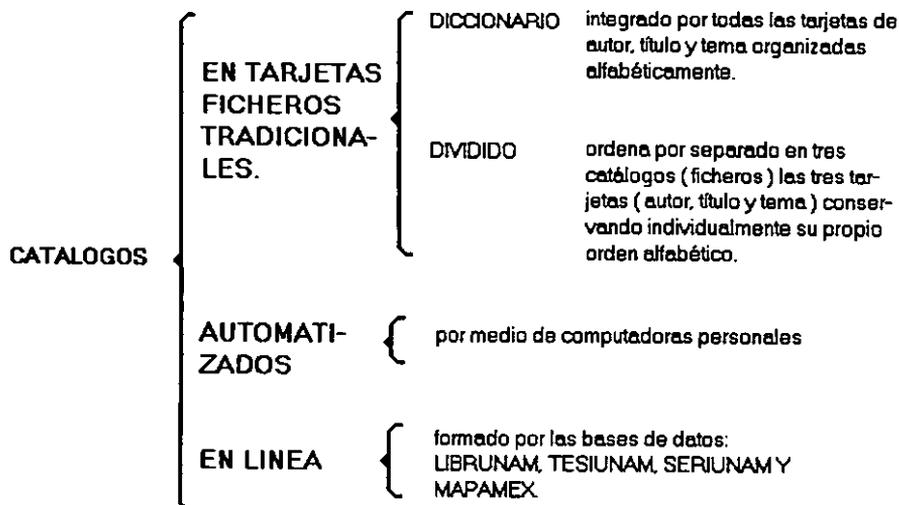
La localización de los libros, por lo regular se efectúa por medio de catálogos. Dentro del sistema bibliotecario de la UNAM, existen tres tipos de catálogos. Ver Cuadro 1.7

1.4.2.1.1 Catálogos tradicionales

La clasificación por tarjetas o ficheros tradicionales es la más usual en el sistema Bibliotecario Nacional, presentando la información por escrito en fichas catalográficas de cartulina bristol con la información separada en tres secciones:

- autor
- título
- materia o tema

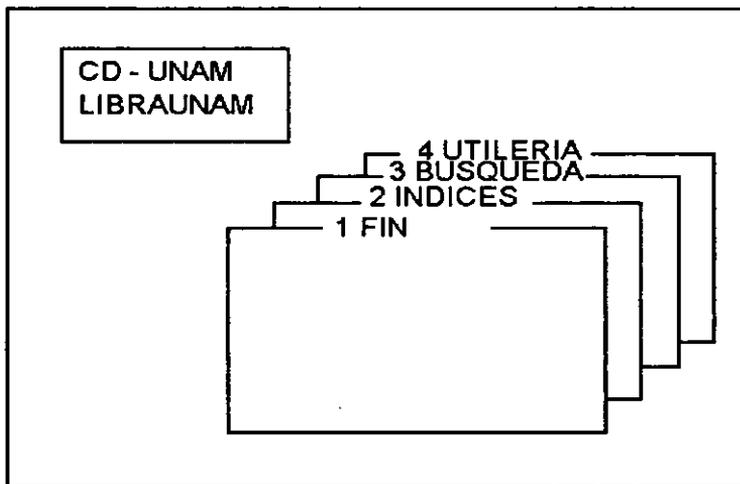
Cuadro 1.7 Tipos de catálogos bibliográficos.



FUENTE: José Luis Almanza Morales y Minerva del Angel Santillán,
Ven y utiliza los recursos de tu biblioteca . p. 18-28.

1.4.2.1.2 Catálogos automatizados

El sistema de catálogo automatizado o electrónico refiere las fuentes bibliográficas impresas de carácter mayor con los que cuenta la biblioteca, presentando en pantalla un menú principal con 4 opciones, siendo las de **Índices** y **Búsqueda** las que permiten localizar con mayor rapidez la información. El usuario para acceder o ingresar al sistema, requiere utilizar el mouse y el teclado. Ver Fig. 1.1

Fig. 1.1 Sistema de catálogo electrónico.**Pantalla del menu del sistema automatizado.**

1.4.2.1.3 Catálogos en línea.

El catálogo en línea es un sistema automatizado que maneja primordialmente bases de datos las cuales son revisadas y consultadas por el usuario, con ayuda del personal especializado que trabaja en la biblioteca. Este tipo de catálogo proporciona las referencia bibliográfica y la biblioteca donde puede ser localizada la información. as bases de datos de referencias bibliográficas con las que cuenta la Universidad son :

LIBRUNAM es un sistema que contiene las fichas de los libros que existen en los acervos de las bibliotecas de la UNAM. Permite la localización de las fuentes por medio de los

elementos básicos como: nombre de autor, título, tema, colección o serie y editorial, principalmente.

TESIUNAM contiene el acervo de tesis elaboradas por estudiantes de licenciatura y posgrado que están localizadas en la Biblioteca Central. Las tesis son de alumnos de la UNAM, así como de escuelas y universidades incorporadas y no incorporadas.

SERIUNAM presenta información sobre las colecciones de publicaciones de carácter periódico como por ejemplo revistas; que existen en bibliotecas de educación superior y de investigación científica a nivel nacional.

La diferencia entre los dos últimos tipos de catálogos es la actualización de la información, siendo la de línea la que maneja información más novedosa dentro de las bases de datos.

1.4.2.1.4 Ejemplo de búsqueda

Para el uso del catálogo automatizado o electrónico.

Con la opción índices:

De las diez alternativas presentadas, se recomienda utilizar: autor personal, para apellidos; autor corporativo, para instituciones u organismos internacionales, autor simposio, según el caso; título para títulos exactos; materia para encabezamientos

bibliotecológicos, p. ej: Química - Manuales, Química - Orgánica, Arte - Historia; etc. No se refiere a materias académicas como Físicoquímica II, Matemáticas I ; etc.

Las otras se utilizan por el personal bibliotecario o por usuarios avanzados que conozcan y manejen el esquema de clasificación para material bibliográfico. La alternativa RETORNA envía al menú principal.

Para opción Búsqueda por palabras:

Presenta las mismas alternativas, sólo que la estrategia de búsqueda será diferente, en la ventana **TEXTO?**, deberá indicarse el campo donde se requiere la información, si no se indica la búsqueda se hará de forma libre y la palabra o palabras indicadas serán rastreadas y recuperadas en todos los campos, un ejemplo específico puede ser:

\$AUT Geankoplis

\$TIT Procesos de transporte

\$TEM Evaporación

En esta opción pueden combinarse tantos campos como sean necesarios con objeto de recuperar una ficha determinada.

Para el uso de catálogos en línea:

El procedimiento de búsqueda en ellos se lleva a cabo de la misma manera, la ventaja de utilizarlos es lo actual de la información, toda vez que en éstos se trata de recuperar

alguna referencia bibliográfica, se accede directamente a la base de datos de alta en el Banco de Datos general denominado LIBRUNAM.

En el caso específico del catálogo electrónico, se recomienda no intentar utilizar las alternativas de la opción UTILERIAS, ya que éstas se reservan para el personal bibliotecario y especializado únicamente; en particular, la alternativa COPIA ya que ésta se encuentra deshabilitada y al pretender acceder a ella puede bloquearse el sistema y dañar el software de búsqueda y recuperación.

1.4.2.1.5 Ejercicios

- 1) De las referencias bibliográficas citadas al final del texto, escoja cinco opciones y efectúe su localización en el catálogo automatizado de la biblioteca por la opción de **índice y búsqueda por palabras**, proporcionando el procedimiento paso a paso que realice para su ubicación.

- 2) De igual forma, solicite al personal calificado le ayude a localizar las referencias bibliográficas básicas para el desarrollo de la investigación documental sobre el tema para su proyecto de investigación en las **Bibliotecas que conforman el acervo de la Universidad** por medio de la consulta de la base de datos LIBRUNAM y anexe la información a su proyecto, así como la metodología que requirió para obtenerla.

1.4.2.2 Localización por kardex hemerográfico

El Kardex funge como un catálogo de las publicaciones periódicas. Se compone de una tarjeta por cada uno de los títulos que integran el acervo. Se encuentran ordenados alfabéticamente y brindan además, información relativa a los volúmenes, números y años en que se han recibido las publicaciones, así como la frecuencia con la que se emiten y el lugar de procedencia, entre otras.

Siendo las publicaciones periódicas en volumen, mayor que el acervo de los libros por sus características especiales, es en ocasiones, difícil el contar con todas las fuentes en un sólo lugar y más problemático aún, el localizar la información específica relacionada a un tema en particular, por lo diverso de las investigaciones y documentos que se manejan en una determinada revista, por señalar un ejemplo.

1.4.2.2.1 Bases de datos

Por lo anteriormente expuesto, algunas dependencias académicas, principalmente de la UNAM como es el caso de la FESC, cuentan con una serie amplia y heterogénea de bases de datos, las cuales recopilan diferentes referencias documentales de tipo hemerográfico que incluyen resúmenes breves o abstracts del contenido del artículo.

La revisión de este material, requiere básicamente, del uso de **PALABRAS CLAVE** relacionadas con el tema de investigación; entre más palabras clave se utilicen, más específica y selectiva será la recopilación de referencias documentales de carácter periódico.

Actualmente la FESC cuenta con 86 bases de datos en CD-ROM de diferentes disciplinas distribuidas en ambos campos de las cuales, Campo 1 cuenta con 33 disponibles, siendo:

- Applied Science & Technology Index
- Biological Abstracts
- Food Science and Technology Abstracts
- Life Sciences

entre otras, las que pueden apoyar a la asignatura en la búsqueda de información referente a **ENZIMAS**.

1.4.2.2.2 Ejemplo de búsqueda

Este es un ejemplo de búsqueda en la base de datos en CD-ROM "Food Science and Technology Abstracts" (FSTA) disponible en Campo 1 de esta Facultad.

El tema tratado fue UREASA.

Para su búsqueda fue necesario delimitar o especificar la información deseada por medio del uso de palabras clave, las cuales fueron proporcionadas al personal capacitado en el manejo de la base de datos bajo su equivalencia al inglés por ser éste el idioma bajo el cual trabaja el programa.

A continuación se transcribe el listado obtenido en la Búsqueda, el cual maneja las palabras clave (y su combinación) y el número de registros asociados con las mismas.

SilverPlatter 3.11

FSTA 1969-9/95

No.	Records	Request
1:	272	UREASE
2:	2013	KINETIC
3:	36456	STUDIES
4:	1	#1 and (KINETIC STUDIES)
5:	18275	EXTRACTION
6:	19	#1 and EXTRACTION
7:	151729	FOOD
8:	3	#6 and FOOD
9:	6886	PURIFICATION
10:	9	#1 and PURIFICATION

Igualmente se presenta una de las referencias obtenidas:

1 of 33

Marked in search: #4

AN ACCESSION NUMBER: 93.02.B0025

TI TITLE: **Kinetic studies** on urea hydrolysis by immobilized **urease** in a batch squeezer and flow reactor.

AU AUTHOR(S): Huang-tc; Chen-DH

AD ADDRESS OF AUTHOR: Dep. of Chem. Eng., Nat. Cheng Kung Univ. , Tainan 70101, Taiwan.

PY PUBLICATION YEAR:1992

SO SOURCE (BIBLIOGRAPHIC CITATION): Biotechnology-and-Bioengineering; 40 (10) 1203-1209, 30 ref.

NU ISSN OR ISBN: ISSN: 0006-3592

LA LANGUAGE OF TEXT: En (English)

SC SUBJECT CODE: Biotechnology

AB ABSTRACT: Immobilization of **urease** on reticulated polyurethane foam, and kinetics of urea hydrolysis by resulting immobilized **urease** in both batch squeezer and circulated flow reactors were studied. **Urease** was immobilized with bovine serum albumin and glutaraldehyde on 7-15 mm polyurethane foam supports. Residual activity of **urease** after immobilization was about 50%. Hydrodynamic properties and flexibility of polyurethane foam were retained in solution after immobilization. A modified biofilm reactor model was used to describe the kinetics of urea hydrolysis in both batch squeezer and circulated flow reactors. The best-fit results were in good agreement with experimental data. This study suggests another application of polyurethane foam in enzyme immobilization and immobilized enzyme reactors. [From En summ. 2

DE DESCRIPTORS: IMMOBILIZATION-; ureases, immobilization & kinetics of;
HYDROLASES-

ID IDENTIFIERS: Enzymes-; Biotechnology-

UD UPDATE CODE: 9302

Se debe observar que la referencia presenta la siguiente información:

- a) Título
- b) Autor(es)
- c) Dirección del autor
- d) Año de publicación

- e) Fuente o referencia bibliográfica
- f) Número de ISSN (International Standard Serial Number, el cual es específico de cada título de publicación periódica)
- g) Lenguaje del texto
- h) Tema
- i) Resumen o abstract
- j) Descriptores o palabras clave

1.4.2.2.3 Ejercicio

- 1.- Del tema que haya seleccionado para su proyecto de investigación, proporcione usted:
 - a) las palabras claves que delimiten el tema (8 como mínimo)
 - b) sus equivalencias al inglés
- 2.- Solicite a su asesor la cita en la base de datos (sea puntual) y proceda a localizar la información en por lo menos 3 bases de datos.
- 3.- No olvide anotar la referencia de CD-ROM
- 4.- Seleccione los artículos que considere más apegados al tema en cuestión
- 5.- Tome en cuenta que algunos de los artículos no estarán disponibles por:
 - a) limitante del idioma del contenido
 - b) ubicación de la referencia (revista)
 - c) año de publicación
 - d) tiempo destinado a la investigación documental

1.5 Recopilación de la información.

1.5.1 Ficha bibliográfica.

Todo libro que vayamos a utilizar para la elaboración del trabajo de investigación, es necesario registrarlo en fichas bibliográficas, las cuales contendrán la información mínima suficiente para identificar la fuente de información. Las fichas bibliográficas tienen una dimensión estandarizada de 7.5 x 12.5 cm., elaboradas en cartulina bristol.

1.5.1.1 Contenido de la ficha bibliográfica.

Para la elaboración de las fichas bibliográficas es necesario contemplar las siguientes reglas:

1.5.1.1.1 Nombre del autor.

- 1.- Se inicia por el o los apellidos.
- 2.- Cuando son dos autores, se anotan ambos en el orden de aparición en la portada.
- 3.- En caso de ser más de tres autores, se asientan los tres primeros seguidos por la locución **et al.**; abreviatura de **et alli** o **et alius**, que significa " y otros " precedida por puntos suspensivos.
- 4.- A veces el libro está formado por varios escritos de diversos autores. En este caso, se asienta el nombre del editor o compilador seguido de la especificación **"ed."** o **"comp."**.

- 5.- Las preposiciones de los apellidos compuestos se pondrán al final. p. ej. Fuente, Arturo de la.
- 6.- Quedan igual los apellidos como O' Connors, O' Donojú y aquellos como McGregor y Mc Arthur.
- 7.- Títulos académicos y nobiliarios, por lo general se excluyen, pero en el caso de que se desee especificarlos, deberán ir al final abreviados.
- 8.- Los nombres clásicos y medievales se asientan como están, p. ej. Dante Alighieri.
- 9.- Los norteamericanos, asientan primero el nombre y después el apellido. En nuestro país, los clasificamos empezando por el apellido.
- 10.- Los portugueses, asientan primero el segundo apellido y luego el primer apellido y el nombre. En nuestro país se registrará iniciando con el primer apellido.
- 11.- Si el autor se presenta bajo un seudónimo se escribirá éste, y si se conoce el nombre se anotarán ambos: nombre y seudónimo.
- 12.- Para publicaciones de carácter oficial, el asiento del autor corresponde al país donde se hace la publicación y después de éste se anotará la dependencia gubernamental responsable de la edición en México.
- 13.- Las obras de consulta, se anotarán generalmente por el título de la obra, p. ej. _ Enciclopedia Británica .

1.5.1.1.2 Título del libro.

- 1.- Debe obtenerse de la portada, que normalmente lo presenta completo.
- 2.- Se debe subrayar el título completo con el fin de destacarlo o bien cambiar el tipo de letra con la misma finalidad.

1.5.1.1.3 Traductor y prologuista.

- 1.- Se escribe nuevamente el nombre del autor iniciando por el nombre y luego los apellidos; antecedido por una diagonal, separándolo así del título de la obra.
- 2.- El nombre del traductor se escribirá inmediatamente después precedido por un punto y coma. Se iniciará por el nombre y luego irán los apellidos.
- 3.- El nombre del prologuista sólo se anotará en el caso de que sea diferente al autor del libro y si éste se considera importante.
- 4.- El nombre del prologuista irá precedido por la abreviatura **prol.**

1.5.1.1.4 Número de volumen y de edición.

- 1.- Si el texto pertenece a una obra en varios volúmenes, deberá anotarse el número que le corresponde, antecedido por la abreviatura **vol. o v.**
- 2.- También puede utilizarse la palabra **tomo o t.**
- 3.- Cuando el libro es primera edición, no se indica.
- 4.- De la segunda edición en adelante, se señala de forma abreviada, p. ej. **2 ed.**

1.5.1.1.5 Lugar de impresión, editorial y año de publicación

(pie de imprenta).

- 1.- Se anotan los tres datos juntos, iniciando por el lugar de impresión, luego la editorial y después el año de publicación.
- 2.- Si no se encuentra alguno de estos datos, hay que revisar la contraportada, DONDE

ESTA el copyright (derecho de autor) o el colofón (en la última hoja del texto), donde aparecen datos sobre el domicilio de la imprenta y la fecha en que se concluyó la impresión.

- 3.- El lugar de impresión, se refiere a la ciudad y no debe confundirse con el domicilio de la editorial o de la imprenta. Irá inmediatamente después del nombre del traductor y será precedido **por un punto y dos guiones**.
- 4.- El nombre de la editorial se separa del lugar de edición **por dos puntos**, omitiendo las partículas Ed. , Edit. ; etc.
- 5.- La fecha o año de publicación será la que corresponde a la última edición. Se separa del nombre de la editorial **por una coma**.
- 6.- En caso de faltar algún dato referido a estos tres, se indica en el lugar correspondiente alguna de las siguientes anotaciones entre corchetes :
[s.l.] sin lugar de edición
[s.n.] sin nombre de editorial
[s.a.] sin año de publicación
si faltan todos se indica:
[s.p.i.] sin pie de imprenta.
- 7.- Cuando la editorial es más conocida por las siglas se acostumbra utilizar estas, p. ej. **FCE, UNAM**; siempre y cuando esto no represente confusión en su uso, de ser así se escribe el nombre completo.

1.5.1.1.6 Colección o serie.

La colección se indica poniendo entre paréntesis el nombre y el número al que pertenece separados por punto y coma a continuación de la paginación o descripción física.

1.5.1.1.7 Páginas.

- 1.- En muchos libros hay numeración romana y arábica; éstas se escribirán como aparecen.
- 2.- Las páginas se cuentan hasta la última numerada del texto, incluyendo índices y bibliografías.
- 3.- Algunas ediciones incluyen hojas para hacer propaganda a la editorial o a otros libros, estas páginas se excluyen de la numeración.

1.5.1.1.8 Ubicación.

- 1.- No es indispensable anotarla, aunque es útil cuando se manejan diferentes fuentes. De querer añadirlas, se proporciona el número de colocación y la biblioteca en la cual se localiza la obra.
- 2.- Puede indicarse solamente la biblioteca en la cual está ubicada la obra.

1.5.1.2 Ejemplos de fichas bibliográficas.

a) de Libro

GEANKOPLIS, Christie J. Procesos de transporte y operaciones unitarias / Christie J.

Geankoplis ; Antonio Eroles Gómez.- - México : Continental , 1989. 759 pp.

ELONKA , Steve , comp. Equipos industriales : guía práctica para reparación y mantenimiento / comp. Steve Elonka ; Francisco G. Noriega, Federico Ling Altamirano.- - México : McGraw-Hill , 1988. Vol. 1. : il.

b) de Tesis.

Las fichas para el registro de tesis, varían ligeramente del formato que se describió anteriormente. Para su descripción , es necesario anexar después del lugar de impresión, el año de elaboración y páginas el término de "Tesis", el nombre de la Carrera Profesional, el nombre de la Escuela, así como el nombre de la Universidad, **todo separado por comas**. Un ejemplo es:

MONDRAGON MILLÁN, Luis Antonio. Manual del paquete terminal de enzimas de uso alimentario / Luis Antonio Mondragón Millán.- - Cuautitlán Izcalli, Mex., 1993.
Tesis, Ingeniería en Alimentos. UNAM, FES . Cuautitlán . 247 p.

c) de Enciclopedia

Enciclopedia ciencia : ciencias físicas y biológicas en general / Comp. Grolier.- - 3 ed.- - México : Cumbre, 1981. v.2.

1.5.1.3 Ejercicio.

- 1.- Elaborar cinco fichas bibliográficas por persona a partir de diferentes fuentes bibliográficas. No es necesario que sean de un tema en específico.
- 2.- Consulte con su asesor la forma en que fueron elaboradas y verifique si no hay error en su contenido.
- 3.- Elabore cuantas fichas bibliográficas sean necesarias para capturar las fuentes de información relacionadas con el tema elegido para su proyecto de investigación.

1.5.2 Ficha hemerográfica.

La ficha hemerográfica se utiliza para registrar las publicaciones periódicas y seriadas . Se elaboran en tarjetas de 7.5 x 12.5 cm de cartulina bristol. ⁸

⁸ Para mayor información detallada sobre la elaboración de fichas hemerográficas para otro tipo de documentos de carácter periódico como folletos o abstracts, consultar los autores citados en las notas de pie de página (4) p. 42 - 48 y (6) p. 79 - 87 de esta guía.

1.5.2.1 Contenido de la ficha hemerográfica.

Para el registro de revistas, se debe anotar la siguiente información:

1.5.2.1.1 Nombre del autor.

- 1.- Se comienza por los apellidos y escritos en letras mayúsculas.
- 2.- Cuando no aparezca se asentará por título.

1.5.2.1.2 Título del artículo.

- 1.- Se escribe el título del artículo o fragmento de la obra.
- 2.- Irá entrecomillado para distinguirlo de la publicación y se separa del nombre del autor

POR UNA COMA.

1.5.2.1.3 Título de la publicación.

- 1.- Se anota el título de la publicación donde aparece el artículo.
- 2.- Para diferenciarlo irá subrayado y se separa del título del artículo **POR UNA COMA.**

1.5.2.1.4 Lugar de edición.

- 1.- Se proporciona el lugar donde se edita.
- 2.- No es indispensable pero se sugiere anotar país y estado para tener la referencia

completa.

1.5.2.1.5 Datos de edición.

- 1.- Se anotan el volumen, número y año en que se efectuó la aparición del documento en la revista.
- 2.- Se inicia por el volumen **PRECEDIDO POR UNA COMA** para separarlo del nombre de la publicación.
- 3.- Se anota inmediatamente el número, mes y año de la publicación separando cada uno **POR COMAS**.
- 3.- Se anotarán la página o páginas entre las que se encuentra el artículo o capítulo; si son continuas, se indicará con un guión ; si son discontinuas se indicará con **UNA COMA** e irán precedidas **POR DOS PUNTOS** para separarlas del año de publicación.

1.5.2.2 Ejemplos de fichas hemerográficas

TING - CHIA, Huang y Dong - Hwang Chen, " Kinetic studies on urea hydrolysis by immobilized urease in a batch squeezer and flow reactor " ;
Biotechnology and Bioengineering, 1992, v. 40, n. 10, Dec. 5 :1203 - 1209.

Che Man , Y. B. ... et al., " Effects of soaking soybeans in dilute acids on biologically active components " ; JAOCS *, 1991, 68 (7) : 471 - 473. **

* JAOCS = Journal of the American Oil Chemists' Society

** Forma abreviada de exponer el Volumen y el Número de la fuente

El - Shimi - NM, " Control of enzymatic browning in apple slices by using ascorbic acid under different conditions " ; Plant Foods for Human Nutrition, 1993 : 71 - 76

1.5.2.3 Ejercicio.

- 1.- Elaborar cinco fichas hemerográficas por persona a partir de diferentes fuentes periódicas. No es necesario que sean de un tema en específico.
- 2.- Consulte con su asesor la forma en que fueron elaboradas y verifique si no hay error en su contenido.
- 3.- Elabore cuantas fichas sean necesarias para capturar las fuentes de información relacionadas con el tema elegido para su proyecto de investigación.

1.5.3 Ficha de trabajo.

Las fichas de trabajo son el instrumento esencial de la recolección de datos. En ellas se recopila el material que necesitamos de las fuentes de información. Las fichas de trabajo se escriben en tarjetas o papeletas de 22 cm por 13.4 cm de cartulina bristol.

1.5.3.1 Contenido de la ficha de trabajo.

Toda ficha de trabajo tendrá los siguientes datos :

- 1.- Se colocan en el ángulo superior derecho y son tres: apellido o apellidos del autor, seguidos por coma; primera palabra o palabras del título de la obra, subrayada y seguida por puntos suspensivos, y la página o páginas de las que se tomó el dato o información que se considera importante.

1.5.3.1.1 Regesto.

- 1.- El regesto, título, cabeza o encabezado, se coloca centrado en la parte superior de la tarjeta.
- 2.- Hace las veces del encabezado periodístico; nos da la mayor información del contenido en el menor número de palabras. Nos ahorra tener que leer toda la tarjeta, nos permite ordenarla y clasificarla.
- 3.- Va subrayado o en mayúsculas para destacarlo del resto del texto.

1.5.3.1.2 Categoría general.

- 1.- Categoría general o complemento del regesto: se coloca en el ángulo superior izquierdo.
- 2.- Se refiere al tema general de la investigación, aunque también puede indicar una clasificación cronológica, la de nuestro esquema preliminar o alguna indicación para ordenar nuestras fichas. Puede excluirse si se considera no importante.

1.5.3.1.3 Contenido o texto.

- 1.- Se coloca en el resto de la tarjeta.
- 2.- En caso de que se necesite más espacio, podrá utilizarse la parte posterior, y si aún no fuese suficiente el espacio, podrán utilizarse otras tarjetas con una guía que identifique a la tarjeta de que se trata.
- 3.- Esta guía tendrá el apellido del autor en el ángulo superior izquierdo; el número de la tarjeta en la parte central entre guiones, y la primera palabra o palabras del regesto seguida de puntos suspensivos en la parte superior derecha.

1.5.3.1.4 Comentarios

- 1.- Los comentarios o aclaraciones se colocan al final del texto de la tarjeta, aislándolas para no confundirlas con las opiniones del autor consultado.
- 2.- Las aclaraciones son de la persona que efectúa la investigación. No es necesario efectuarlos, aunque son muy útiles al momento de ordenar la información.

1.5.3.2 Tipos de ficha de trabajo.

De acuerdo al contenido, existen cuatro tipos de fichas de trabajo: de extracto o digesto, de resumen, de datos aislados y de citas textuales.

1.5.3.2.1 Ficha de trabajo, de extracto o de digesto.

Es recomendable su uso ya que ahorra tiempo en el momento de efectuar la redacción del documento ayudando a que la persona que efectúa la investigación procure asimilar la información recopilada y no solamente a copiarla de documento a documento.

Las anotaciones de extracto que se elaboran son con las propias palabras del investigador ordenándolo y registrándolo por medio de la información más importante y esencial del documento analizado, sin que la redacción demerite el mensaje o información que se registró en el documento original. El extracto debe ser breve y concreto.

1.5.3.2.2 Ficha de resumen.

Las fichas de este tipo contemplan las mismas indicaciones que la anterior, la diferencia entre ambas será la extensión de los datos que se analizan.

1.5.3.2.3 Ficha de datos aislados.

Por lo general, ésta se refiere a la extracción de cifras, nombres, fórmulas, fechas o cualquier dato que puede considerarse como individual, puede ocupar toda la tarjeta si es necesario.

1.5.3.2.4 Ficha de cita textual.

Es una ficha que se le considera estrictamente de carácter excepcional. Toda cita que se desee transcribir textualmente como aparece en el documento original, deberá ser inscrita entre comillas. Es recomendable no utilizarle indebidamente, ya que su uso excesivo puede generar una gran cantidad de información inútil debido a que se concreta a copiar los textos y los datos de las fuentes consultadas y retrasa en muchas ocasiones el proceso de análisis, asimilación y redacción del documento que se pretende elaborar.

1.5.3.3 Ejemplos de fichas de trabajo.

a) de extracto o digesto.

Proceso de Investigación	BAENA,
Etapas	Instrumentos...
Inf. Documental	p. 89
Fichas de trabajo	

Ficha de trabajo: de extracto ó digesto.

Estas fichas deben ser de más uso durante la elaboración del proyecto de Investigación. En ella se debe exponer de una forma clara y sencilla la información que se considera de importancia. Su redacción no debe demeritar la información que se registró en el documento original. Este tipo de ficha no debe ser una transcripción de material entre el documento original y el que se desarrolla.

NOTA: Su contenido debe ser breve y concreto.

b) de resumen.

Fenolasa

WITHAKER,

Generalidades

Principles of enzymology for ...
p. 571**Polifenol oxidasa: descubrimiento, clasificación y sinónimos.**

En 1856, Schoenbein describió una enzima en hongos, la cual con ayuda del oxígeno molecular presente en el tejido vegetal llevaba a cabo la oxidación aeróbica de ciertos compuestos en plantas. La polifenol oxidasa es una enzima del tipo oxidoreductasa cuyo nombre sistemático es o - difenol : oxígeno óxido reductasa; su número de clasificación es el EC 1. 10. 3. 1.

Polifenol oxidasa es su nombre común; pero se le conoce también como tirosinasa, polifenolasa, fenolasa, catecol oxidasa, cresolasa y catecolasa.

c) de datos aislados.

Ureasa

ALBERTY,

Generalidades

Advances...
p. 58**Ureasa: reacción hidrolítica catalizada.**

d) de cita textual

Proceso de Investigación	DE LA TORRE,
Etapas	Metodología...
Categoría general	p. 13
Hipótesis de trabajo	

La Hipótesis de trabajo: Justificación.

" representa la estructura mental que elaboramos, el plano teórico que va a servirnos para realizar una investigación y para dar una respuesta, provisional por lo pronto, a la pregunta planteada. "

NOTA: Hipótesis de trabajo y esquema de trabajo o plan, son sinónimos.

1.5.3.4 Ejercicio.

- 1.- Elaborar cinco fichas de trabajo por persona a partir de diferentes fuentes bibliográficas y hemerográficas. No es necesario que sean de un tema en específico.
- 2.- Consulte con su asesor la forma en que fueron elaboradas y verifique si no hay error en su contenido.
- 3.- Elabore cuantas fichas sean necesarias para capturar las fuentes de información relacionadas con el tema elegido para su trabajo final.

1.6 Presentación del material.

1.6.1 El procesamiento de la información.

Dentro del proceso de investigación y posterior a la recopilación de las fuentes de información, se lleva a cabo el análisis y exposición del material.

Es necesario recalcar en este momento, la importancia de contar anteriormente con una metodología de investigación y la estructuración de un PLAN DE TRABAJO. Estos conceptos son valiosos para la elaboración de un trabajo por escrito de buena calidad.⁹

Después de reunir el material en fichas de trabajo, éste se revisa cuidadosamente. En esta etapa del procesamiento, es indispensable verificar si se han cubierto todos los aspectos que conforman nuestro ESQUEMA DE TRABAJO.

Dicho esquema puede modificarse en función del material. Conforme la información se revise, se irá ordenando de acuerdo al esquema modificado conservando la relación de capítulos, subcapítulos y acápite, mismo que será fácil de cubrir si se han elaborado adecuadamente las FICHAS DE TRABAJO, tomando en cuenta si :¹⁰

1. Se refirieron a un solo tema
2. Tienen suficiente información
3. Tienen información excesiva

⁹ vid supra , tema 1.2 de esta guía (pags. 11 - 17) para mayor información.

¹⁰ vid supra , subtema 1.5.3 de esta guía (pags. 60 - 65) para mayor información.

4. Cubren en su totalidad cada apartado del esquema.

Igualmente es necesario tener en cuenta si el material recopilado, la búsqueda y procesamiento, cumplen con las hipótesis planteadas en el plan de trabajo. El nivel de análisis de la información estará en función:

1. Del tema elegido :

- a) Si es poco revisado y solamente se efectúa una descripción y recopilación del material; generalmente no se espera una alta calidad de análisis.
- b) Si es muy revisado no será suficiente con la recopilación del material, también requerirá de una excelente interpretación y calidad de análisis que proporcione nuevas expectativas de desarrollo e investigación.

2. Del objetivo para el cual se efectúa la investigación.

3. Del tipo de trabajo escrito que puede ser, entre otros, ensayo, informe, o tesis ya sea de licenciatura, maestría o bien doctorado.

1.6.1.1 Redacción preliminar

En esta etapa se inicia la redacción preliminar del documento, utilizando las fichas de trabajo procediendo a ordenarlas según el esquema. Los registros de las fichas pueden desaparecer o bien formar parte como subtítulos, dependiendo de la forma en que se elaboraron las fichas; en ocasiones sólo será necesario unir su contenido por medio de conjunciones o adverbios, mientras que en otras se deberá efectuar una síntesis o resumen de varias tarjetas. Las notas y comentarios que contengan darán un carácter

personal sobre nuestro trabajo. Se deberá incluir en esta primera redacción un elemento muy importante conocido como APARATO CRÍTICO.

1.6.1.2 Aparato crítico.

El aparato crítico o citas bibliográficas, es el elemento de investigación que permite concretar un trabajo fundamentado en las referencias bibliográficas o fuentes y le proporciona confiabilidad a la información presentada en el trabajo escrito. "Nuestro trabajo será digno de confiabilidad en la medida en que demos crédito a los autores que utilizamos en la investigación".¹¹

El aparato crítico puede estar formado por:

1.6.1.2.1 Notas de cita.

Proporcionan la fuente o referencia bibliográfica exacta: e.g. vid. nota (11) de esta guía.

1.6.1.2.2 Notas de contenido.

Incluyen la definición del término que empleamos y la explicación complementaria, idea secundaria o argumento: e.g. vid. infra , nota (12) de esta guía.

¹¹ Guillermina Baena Paz, op cit. , p. 99

1.6.1.2.3 Notas de referencia cruzada.

Son las que remiten al lector a otra página, otra sección o capítulo del mismo trabajo para relacionar o completar datos: e.g. vid. supra, nota (9) de esta guía.

1.6.1.2.4 Inclusión del aparato crítico.

Las notas de pie de página o citas bibliográficas pueden escribirse dentro del texto, al final de cada página, al final de cada capítulo o al final del texto.

1.6.1.2.4.1 Dentro del texto.

Debe ser breve, escribirse entre paréntesis el o los apellidos del autor seguido de dos puntos y el número de la página de la que se extrajo. La referencia completa se dará al final en la bibliografía. Un ejemplo de escritura de cita bibliográfica dentro del texto es : ¹²

"La diferencia molecular (o el transporte molecular) puede definirse como la transferencia (o el movimiento) de moléculas individuales a través de un fluido por medio de los movimientos individuales y desordenados de las moléculas" (Geankoplis:321)

Esta forma no se utiliza cuando se citan DOS O MAS OBRAS DEL MISMO AUTOR.

Requiere que los datos de la fuente estén al final del documento y completos.

¹² Se utilizó un extracto de otro libro ajeno al material en revisión para la elaboración de esta guía con el fin de ejemplificar el uso del aparato crítico exclusivamente.

1.6.1.2.4.2 Al pie de la página.

Son las más recomendables para su lectura ya que solamente se incluye en el texto por medio de un símbolo como puede ser un asterisco o un número y su referencia se hace al final de la página. Se debe procurar que las citas incluyan el número de página, ya que esto distrae la lectura. Utilizando el ejemplo anterior:

"La diferencia molecular (o el transporte molecular) puede definirse como la transferencia (o el movimiento) de moléculas individuales a través de un fluido por medio de los movimientos individuales y desordenados de las moléculas" (*).

Se presenta la forma en que se escribe la referencia bibliográfica al final de la hoja :

(*) Christie Jean Geankoplis, Procesos de transporte y operaciones unitarias , p. 321 .

dejando la referencia completa para su asentamiento al final del documento en la bibliografía general.

1.6.1.2.4.3 Al final de cada capítulo.

Se utilizan cuando la obra está escrita en partes o capítulos, siempre y cuando su inclusión dentro del texto pueda alterar el contenido. La numeración de las notas iniciará y concluirá con cada capítulo. Solamente se escribe un número progresivo en el texto y se revisan las referencias al final del capítulo.

1.6.1.2.4.4 Al final del texto.

Se escriben al final del documento lo cual puede ser molesto para el lector por la pérdida de tiempo y concentración en la lectura que implican, corriéndose el riesgo de ser ignoradas.

1.6.1.2.5 Recomendaciones.

Como se mencionó antes, la nota se destaca dentro del texto por medio de un símbolo o por medio de una numeración progresiva. Se efectuarán en forma abreviada, con la siguiente información: nombre del autor, apellidos, título de la obra cuando se cita por primera vez y, página o páginas entre las que se encuentra el dato. Si la obra es citada a lo largo del texto varias veces, se utilizarán las locuciones latinas correspondientes.¹³

Si el nombre de la obra consultada es muy largo, se puede anotar las cuatro primeras palabras del mismo (o más) seguido de **PUNTOS SUSPENSIVOS**.

La ficha bibliográfica completa de la nota debe incluirse en la bibliografía general. Si son pocas notas, se colocan al final de cada página. No hay número de notas de pie de página, pueden ir hasta ocho o ninguna y se escriben en un tipo de letra más pequeña o a renglón seguido para distinguirlas con respecto del texto.

¹³ Para mayor información sobre las locuciones latinas : definición y uso, revise la referencia anotada en la nota de cita (4); págs. 100 - 102 o bien en la nota de cita (6), las págs. 156 - 160.

1.6.2 Elaboración del reporte por escrito.

1.6.2.1 Portada.

Es la presentación del Trabajo de Investigación por escrito que se ha desarrollado y requiere presentar la siguiente información. ¹⁴

- a) Nombre de la Institución.
- b) Título del trabajo de investigación completo.
- c) Clasificación del informe, que puede ser:
 - Monografía
 - Memoria
 - Trabajo didáctico
 - Tesis, etc.
- d) Nombre del autor o Investigador.
- e) Nombre del asesor(es).
- f) Lugar donde se desarrolle el trabajo.
- g) Año de elaboración.

Proporcionando éstos datos será más fácil identificar posteriormente el trabajo elaborado e igualmente podrá servir como referencia para otros investigadores. Un ejemplo de estos requisitos puede ser :

¹⁴ Considerar :

- 1.- Los incisos c) y e) son opcionales y pueden no incluirse en la portada, siendo decisión del autor de la obra.
- 2.- El autor del escrito puede alterar el orden de los datos pero NUNCA OMITIRLOS.

- a) UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
- b) MANUAL DEL P.T. DE ENZIMAS DE USO ALIMENTARIO
- c) Tesis
- d) LUIS ANTONIO MONDRAGON MILLAN
- e) I.B.Q. J. FRANCISCO MONTIEL SOSA
- f) Cuautitlán Izcalli, Edo. Méx.
- g) 1993.

1.6.2.2 Dedicatorias.

Las dedicatorias son elementos que pueden o no estar presentes en el trabajo escrito, dependiendo del autor del mismo. Pueden incluirse además agradecimientos breves a personas que ayudaron o colaboraron en la elaboración del trabajo de investigación o bien, en la redacción, corrección de estilo y presentación del Informe escrito. No existen reglas en su contenido ni en la forma, solamente se sugiere su asentamiento antes de la introducción.

1.6.2.3 Prólogo.

Es la presentación del tema que es desarrollado en el trabajo de investigación. Puede ser elaborado por el autor o bien por alguna otra persona que esté familiarizada en la materia, como por ejemplo el asesor. El prólogo debe ser breve e incluir datos que no son necesariamente reflejo del material contenido en el texto, como por ejemplo explicaciones

complementarias que influyeron en su desarrollo. Se le conoce también como: Palabras preliminares, prefacio o advertencia.

1.6.2.4 Introducción.

La introducción es el elemento que permite al lector, conocer un poco el contenido del Trabajo de Investigación. Le explica de que tratará el informe, le expone la metodología con la cual se desarrolló, así como los alcances y las limitaciones del mismo. La importancia de la introducción, radica en aportar los datos suficientes relacionados al texto que favorezcan la lectura del documento por el lector, haciéndolo atractivo e interesante. Es conveniente hacer notar que la Introducción SE ESCRIBE después de haber elaborado el texto y culminado la investigación.

1.6.2.5 Texto.

Es el cuerpo del trabajo escrito y contiene todo el material que se obtuvo en las fichas de trabajo, mismas que fueron ordenadas y concentradas en el documento el cual debe estar bien redactado y analizado. Este texto puede incluir material como tablas, gráficas, mapas si el autor así lo decide o bien, puede manejarlos como un apéndice.

1.6.2.6 Conclusiones.

Las conclusiones son elementos que plasman los aspectos más importantes de la investigación. Éstas deben ser cuidadosamente elaboradas porque serán las que ratifiquen la o las hipótesis que fueron generadas en un principio por el autor y darán pie

para la proposición de nuevas hipótesis de investigación. Debe procurarse exponerlas de forma ordenada y sistemática para que sean claras en su contenido. Se recomienda manejar las conclusiones como ideas que van de lo particular a lo general; en ellas se sintetizará los resultados de la investigación. Las conclusiones siempre se escriben **UNA VEZ TERMINADO EL TEXTO**.

1.6.2.7 Elementos secundarios.

Los elementos secundarios son el apéndice, los índices y las fuentes generales de información, que fueron utilizadas en el Trabajo de Investigación.

1.6.2.7.1 Apéndice.

Incluye datos complementarios en forma de tabulaciones, gráficos, documentos, copias, cuestionarios, cronologías, entrevistas y todo aquel elemento que sea apoyo o ilustración del texto. Todo esto será material que sea considerado por el autor como necesario para darse a conocer. El apéndice puede ir distribuido a lo largo del texto; sin embargo, es más frecuente en la actualidad colocarlo al final del texto. Esto quedará a criterio del autor así como la extensión del mismo.

1.6.2.7.2 Índice.

Es la lista del contenido general del trabajo escrito. El índice puede ser de varios tipos:

- de Contenido
- Onomástico
- Temático
- Analítico
- Biográfico.

De éstos, el índice de contenido o sumario es la lista de temas de contenido de una obra. Puede recurrirse al esquema elaborado en la investigación, el cual fue modificándose conforme avanzaba el trabajo y recopilación de la información. El esquema generalmente contiene ya marcados los capítulos, subcapítulos y acápites que dividen el texto, sólo será necesario anotar las páginas en las que se mencione cada tema. El índice puede colocarse al inicio de la obra, recibiendo el nombre de SUMARIO o en la parte posterior, recibiendo la denominación de INDICE GENERAL, CONTENIDO o INDICE .

1.6.2.7.3 Bibliografía.

En esta parte del documento escrito se asentarán las fuentes consultadas con **TODOS LOS DATOS COMPLETOS** que permitan verificar, localizar y consultar posteriormente la información de referencias presentadas. Se recomienda manejar la información recopilada en las fichas bibliográficas y hemerográficas y ordenarlas por orden alfabético.¹⁵

¹⁵ Es conveniente para el autor que clasifique sus fuentes de información conforme a su importancia para la elaboración de la obra. Para mayor información al respecto, refiérase al tema 1.3 asentado en las páginas 32 - 36 de esta guía.

Cabe destacar que la información que debe asentarse en la presentación de las fuentes no puede omitirse, si se considera que el Aparato Crítico que se ha manejado en la obra, es en sí ya la mención de las fuentes de consulta. Debemos recordar y aclarar que el Aparato Crítico no son referencias completas y que por ello es requisito la inclusión de las fuentes consultadas lo más completas posibles.

Capítulo 2 .

PRACTICA DEMOSTRATIVA No. 1

ENZIMA MODELO :

UREASA.



2.1 Generalidades sobre la enzima ureasa.

2.1.1 Antecedentes.

La UREASA, es una enzima que ocupa un lugar muy especial en la historia de la bioquímica; su estudio data del año 1926, siendo J. B. Sumner, la primera persona en aislarla en forma cristalina a partir del Jackbean (*Canavalia ensiformis*), obteniendo este estudio el Premio Nobel en ese mismo año.¹⁶

Muchos estudios se han desarrollado a partir de este descubrimiento en el cual Sumner proporcionó evidencia de que la biocatálisis de la enzima era proteínica.

2.1.2 Nombres sinónimos.

La ureasa recibe también el nombre de Urea amidohidrolasa.

2.1.3 Clasificación.¹⁷

La ureasa se clasifica dentro de la clase de las **Hidrolasas**, catalizando la hidrólisis de las amidas.

Su número de clasificación es el : EC 3.5.1.5

¹⁶ J. B. Sumner, cit pos., B. Atkinson; J. Rott e I. Rousseau . Characteristics of unbuffered ... , p. 1042.

¹⁷ Ashwani Kumar Rai . Purification and properties of urease ... , p. 319.

2.1.4 Sustrato.

La Ureasa se caracteriza por ser una enzima con especificidad absoluta hacia su sustrato

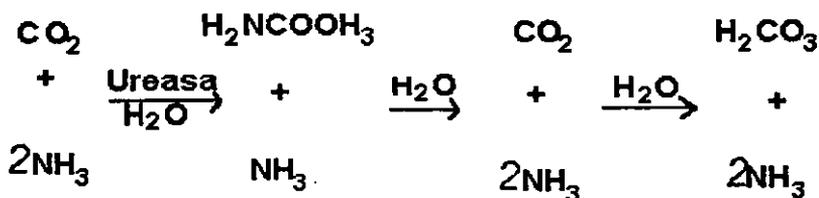
LA UREA, la cual hidroliza para dar CO₂ y NH₃.

2.1.5 Reacción enzimática.

La ureasa interviene en la hidrólisis del sustrato bajo la siguiente reacción : ¹⁸



El mecanismo de reacción aún no es del todo comprendido, sin embargo Blakeley, Webb y Zerner en su publicación, han demostrado que existe una transferencia de carbamil y que el carbamato es el primer producto; modificando la reacción a : ¹⁹



¹⁸ Research for enzymatic ... , p. 320.

¹⁹ R. L. Blakeley; E. C. Webb y B. B. Zerner , cit pos. , B. Atkinson; J. Rott e I. Rousseau .
Characteristics of unbuffered ... , p. 1042.

2.1.6 Constante de Michaelis.

En el caso particular de la enzima ureasa , obtenida de la *Canavalia ensiformis* , la Constante de Michaelis es : $1.05 \times 10^{-2} \text{ mol / l}$, utilizando la urea como sustrato y bajo condiciones de $\text{pH} = 7.0$ y $T^\circ = 25^\circ\text{C}$, y con Buffer de fosfatos. ²⁰

2.1.7 Cofactores.

Entre los cofactores o efectores más utilizados para la enzima Ureasa se ha observado que el Na^+ y el K^+ son los más efectivos, siendo también un activante el fósforo. ²¹

Wall y Laidler reportan que la glicina, alanina y tirosina tienen también efecto activante. ²²

Atkinson reporta haber tenido que utilizar EDTA como cofactor para aumentar la actividad de la ureasa inmovilizada en gel después de haberla inhibido anteriormente. ²³ Dumitriu et al. mencionan el uso de diclohexilcarbodimida disuelta en tetrahidrofurano como activante de ureasa inmovilizada en gel de Carboximetilcelulosa. ²⁴

²⁰ B. Atkinson; J. Rott e I. Rousseau . Characteristics of unbuffered ... , p. 1050.

²¹ Research for enzymatic ... , p. 321.

²² M. C. Wall y K. J. Laidler , cit pos. , R. A. Alberty . Advances in enzymology... , p. 60.

²³ B. Atkinson et al. , op cit. , p. 1050.

²⁴ Severian Dumitriu ; Marcel Popa ; Vlad Artenie y Florin Dan . Bioactive polymers. 56 : urease ... , p. 284.

2.1.8 Inhibidores.

La enzima ureasa obtenida del Jackbean , presenta inhibición de tipo competitiva con la Suramina y la Thiourea. De igual forma presenta inhibición por producto (NH_4^+) en altas concentraciones. ²⁵

2.1.9 Peso molecular.

El peso molecular de la enzima ureasa, obtenido de la *Canavalia ensiformis* , es de 48,000 , presentando de 3 a 4 sitios activos con inhibición reversible con iones de plata. Se cree que estos sitios activos son grupos sulfhidrilos (-SH). ²⁶

2.1.10 Estructura

La ureasa del Jackbean, es un hexámero de estructura homogénea con subunidades idénticas de secuencia conocida de aminoácidos. Presenta dos iones de níquel por subunidad y según estudios realizados, éstos iones metálicos son coordinados aparentemente por uniones de oxígeno y nitrógeno. ²⁷

²⁵ Research for enzymatic..... , p . 321.

²⁶ R. A. Alberty , Advances in enzymology... , p . 58.

²⁷ Matthew J. Todd y Robert P. Hausinger . Purification and characterization of the ... , p . 5963.

2.1.11 Puerza requerida y estabilidad.

La enzima purificada debe presentar actividad mayor o igual a 5 - 100 U/ mg de sustancia a $T^{\circ} = 25^{\circ}\text{C}$.²⁸

Se sabe que la ureasa inmovilizada en gel de carboximetilcelulosa (CMC) , presenta estabilidad térmica y que su actividad se mantuvo durante el estudio reportado por arriba del 85% del valor inicial 3 meses después de la síntesis.²⁹

Ahora bien , inmovilizada en un copolímero de Colágeno y poli (glicidilmetacrilato) , presentó una actividad del 80% durando 40 días la enzima bajo éstas condiciones. Después de 60 días de inmovilizada, su actividad bajó a un 18%.³⁰

En el caso de ser inmovilizada en polimetilglutamato su actividad reportada fué del 95%.³¹

²⁸ Research for... , op.cit , p. 321.

²⁹ Severian Dumitriu ; Marcel Popa ; Vlad Artenié y Florin Dan . Bioactive polymers. 56 : urease ... , p . 287.

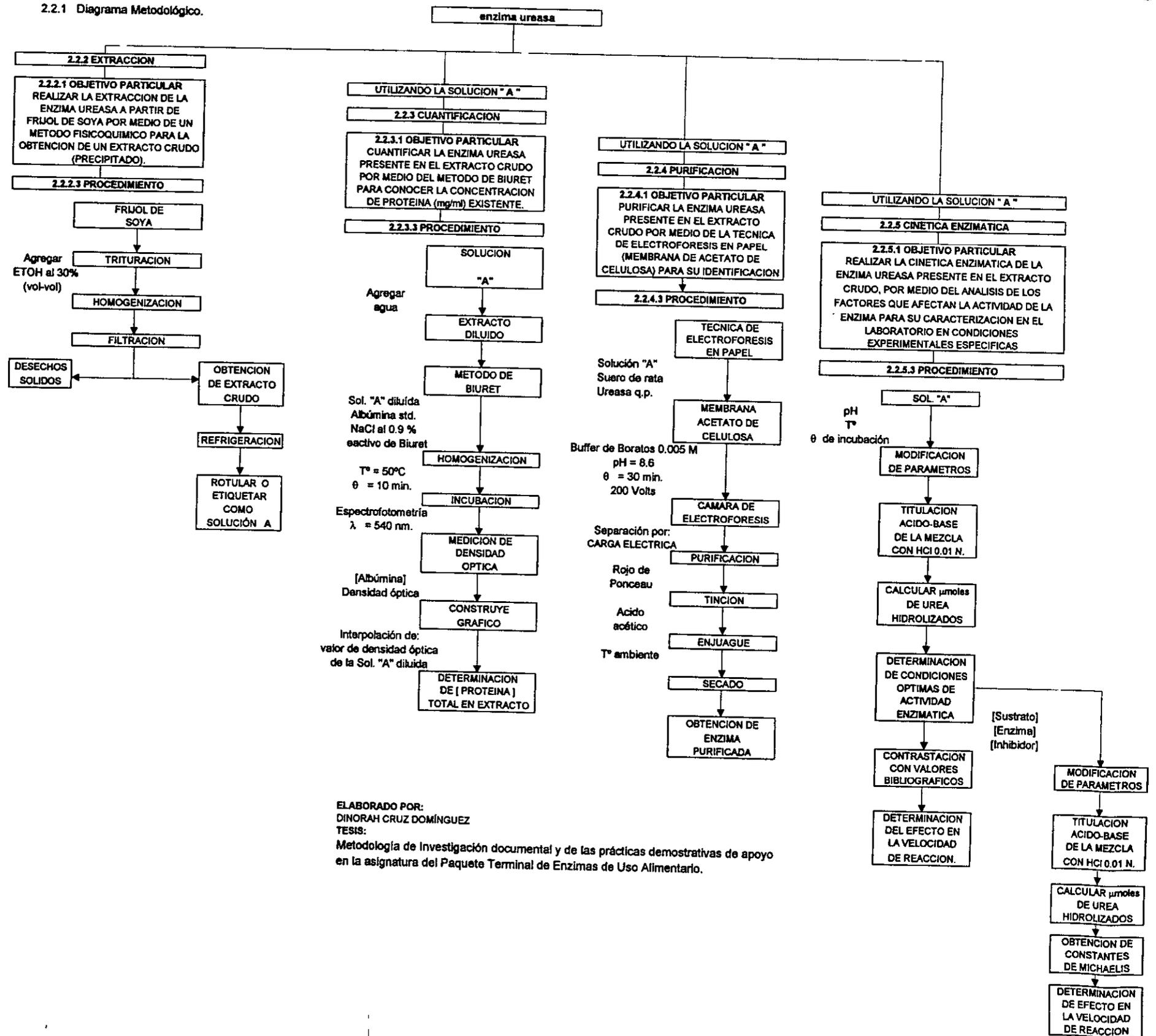
³⁰ K. Raghunath ; K. Panduranga Rao y Joseph K. Thomas . Preparation and caharcterization... , p . 104.

³¹ Yoshiki Minamoto y Yasumi Yugari . Polymethylglutamate as a new ... , p . 1225.

2.2 Actividades propuestas para el estudio de la enzima ureasa.

- EXTRACCION
- CUANTIFICACION
- PURIFICACION
- CINETICA ENZIMATICA

2.2.1 Diagrama Metodológico.



ELABORADO POR:
DINORAH CRUZ DOMÍNGUEZ
TESIS:
Metodología de Investigación documental y de las prácticas demostrativas de apoyo en la asignatura del Paquete Terminal de Enzimas de Uso Alimentario.

2.2.2 Extracción.

2.2.2.1 Objetivo.

Realizar la extracción de la enzima UREASA a partir de frijol de soya por medio de un método fisicoquímico para la obtención de un extracto crudo (filtrado).

2.2.2.2 Material.

por equipo:

- 1 mortero con pistilo grande
- 1 embudo de filtración de cuello largo
- 1 matraz Erlenmeyer de 50ml.
- 1 agitador de vidrio
- 1 pizeta con agua destilada
- 1 escobillón
- 1 tina
- gasa (la necesaria)

por grupo:

- Etiquetas (las necesarias) o bien masking tape.
- 1 frasco de vidrio limpio y seco
- 1 balanza granataria

Reactivos por equipo:

40 ml de etanol al 30% (vol-vol)

0.4 gr. de frijol de soya

2.2.2.3 Procedimiento.

1. Triturar 0.4 gr. de frijol de soya en el mortero y agregarle 40 ml de etanol al 30% (vol-vol) hasta obtener un homogenizado.
2. Filtrar el homogenizado sobre gasa y recuperar el extracto en el matraz Erlenmeyer de 50 ml.
3. Mezclar en un recipiente (frasco de vidrio) el extracto obtenido en el punto 2 con el de los demás equipos para obtener un homogenado.
4. Rotular el recipiente contenedor del extracto crudo con la siguiente información:
signatura, grupo, contenido y nombre del profesor.
5. Conservar el extracto en refrigeración durante toda la experimentación.³²

**ADVERTENCIA : RECUERDE EFECTUAR CADA PROCEDIMIENTO DE
EXPERIMENTACION AL PIE DE LA LETRA Y BAJO LAS
CONDICIONES QUE EN CADA UNO SE ESPECIFICAN PARA QUE
SUS RESULTADOS SEAN REALES Y SE EFECTUE CADA
PRACTICA SIN CONTRATIEMPOS. PUEDE ACUDIR A SU
ASESOR CADA MOMENTO QUE USTED CONSIDERE NECESARIO
PARA QUE LE ACLARE SUS DUDAS.**

³² Lavar con detergente y agua corriente el material ocupado y posteriormente enjuagarlo perfectamente con agua destilada con el fin de retirar las trazas de detergente.

2.2.3 Cuantificación.

2.2.3.1 Objetivo.

Cuantificar la enzima UREASA presente en el filtrado por medio del Método de Biuret para conocer la concentración de proteína (mg/ml) existente.

2.2.3.2 Material.

por equipo:

10 matraces Erlenmeyer de 125 ml

2 gradillas metálicas

3 vasos de precipitado de 100 ml

21 tubos de ensaye grandes

1 termómetro

1 mechero Bunsen

1 tripié

1 tela de asbesto

3 pipetas de 10 ml

3 pipetas de 5 ml

4 pipetas de 2 ml

4 pipetas de 1 ml

1 pizeta con agua destilada

por grupo:

1 espectrofotómetro o medidor Klett

1 celda para espectrofotómetro o filtro para klett (verde)

1 Vortex

Reactivos:

9 ml de solución de albúmina de huevo

0.1 ml de extracto crudo de frijol de soya diluido en 0.9 ml de agua destilada

59 ml de NaCl al 0.9%

47 ml de reactivo de Biuret

2.2.3.3 Procedimiento.

1. Enumerar los tubos de ensaye de la siguiente forma: B, 1,2,3,4,5,U.
2. Colocar en cada uno de los tubos de ensaye los reactivos en las cantidades que se especifican a continuación :

TUBOS	B	1	2	3	4	5	U
albúmina (ml)	-	0.1	0.3	0.5	0.7	1.0	-
extracto diluido (ml)	-	-	-	-	-	-	0.2***
NaCl 0.9% (ml)	3	2.8	2.6	2.4	2.2	2.0	2.8
Reactivo Biuret (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

3. Para el tubo U, se recuerda que se agrega el extracto diluido de la siguiente forma:

3.1 Agregar a 0.1 ml de extracto crudo, 0.9 ml de agua destilada

3.2 Homogenizar

3.3 Tomar la cantidad recomendada para la práctica de cuantificación.³³

4. Mezclar perfectamente el contenido de los tubos por medio del vortex sin derramarlo.
5. Incubar durante 10 minutos los tubos de ensaye a 50°C en el baño maría.
6. Efectuar la lectura de densidad óptica en el espectrofotómetro a 540 nm o bien en el medidor Klett con el filtro verde.
7. Llevar a cabo el procedimiento anterior completo por triplicado.
8. Graficar concentración de albúmina vs. densidad óptica.
9. En la gráfica anterior obtener la concentración de la proteína presente en el extracto crudo por interpolación del dato de densidad óptica obtenido en la experimentación.³⁴

2.2.4 Purificación.

2.2.4.1 Objetivo.

Purificar la enzima Ureasa presente en el precipitado por medio de la Técnica de Electroforesis en papel (membrana de acetato de celulosa) para su identificación .

³³ Este extracto se especifica en el punto 2.2.3.2 de esta guía.

³⁴ Revisar el anexo A.2 de esta guía para conocer el procedimiento de operación del fotocolorímetro Klett Summerson.

2.2.4.2 Material por grupo.

1 cámara de electroforesis

1 fuente de poder

10 imanes

1 caja de membranas de acetato de celulosa

2 tinas de tinción de vidrio con tapa

1 pinza

1 vidrio rectangular

1 vortex

5 tubos capilares

1 pipeta Pasteur con propipeta

2 tinas

1 escobillón

1 pizeta con agua destilada

toallas de papel estrasa (las necesarias)

Reactivos:

50 - 100 ml. Rojo de Ponceau

1 Lt. Sol. amortiguadora de Tris Barbitol pH = 8.8 o la cantidad que se requiera para el tipo de Cámara que se utilice.

250 ml. Ac. acético al 5 % por cada membrana a enjuagar

- 1 ml ó 2 gotas Suero de rata
- 1 ml ó 2 gotas Extracto crudo de frijol de soya
- 1 ml ó 2 gotas Ureasa q.p.

2.2.4.3 Procedimiento.

1. Con mucho cuidado, marcar con un lápiz de manera muy tenue la membrana de acetato de celulosa en el centro (que será la zona de aplicación) y en las orillas la dirección del ánodo y el cátodo, procurando que la membrana no toque ninguna superficie y que tampoco se tome con los dedos.
2. Llenar la cámara de electroforesis con la solución amortiguadora.
3. Sumergir con ayuda de la pinza la membrana de acetato de celulosa en la solución amortiguadora e inmediatamente sacarla y escurrirla.
4. Bajo la asesoría del profesor, colocar la membrana en la cámara de electroforesis y extenderla sin romperla de manera firme con ayuda de los imanes.
5. Colocar una gota de suero de rata con un tubo capilar en la zona de aplicación al centro de la membrana.
6. Proceder de igual forma con la ureasa q.p. y extracto crudo de frijol de soya, manejando entre cada gota, una distancia de aproximadamente 1 cm como se muestra en la Fig. 2.1.

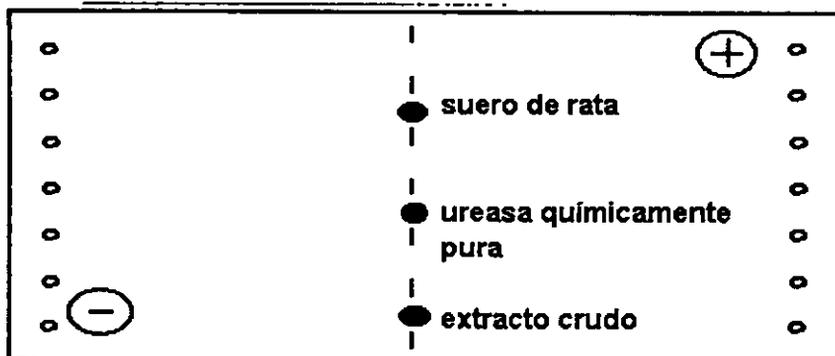


Fig. 2.1 Colocación de muestras de proteínas en la membrana de acetato de celulosa.

7. Colocar la tapa a la cámara de electroforesis y proceder a su conexión a la fuente de poder.³⁵
8. Realizar la purificación a 200 voltios por 30 min.
9. Desconectar la cámara de la fuente de poder y destapar.
10. Retirar con la pinza la membrana de acetato de celulosa y colocarla en la tina de tinción que contiene rojo de Ponceau.
11. Escurrir y colocar la membrana en la tina con ác. acético para su enjuague.
12. Dejar secar a la intemperie.
13. Anote sus observaciones.

³⁵ Tener extrema precaución en el manejo de la cámara al estar ya conectada por manejarse alto voltaje para la técnica de purificación.

2.2.5 Cinética enzimática.

2.2.5.1 Objetivo particular.

Realizar la cinética enzimática de la enzima UREASA presente en el precipitado; por medio del análisis de los factores que afectan la actividad de la enzima para su caracterización en el laboratorio .

2.2.5.2 Material.

por equipo:

10 matraces Erlenmeyer de 125 ml

3 vasos de precipitado de 100 ml

2 vasos de precipitado de 500 ml

2 vasos de precipitado de 250 ml

1 termómetro

2 mecheros bunsen

2 telas de asbesto

2 tripiés

5 pipetas de 10 ml

5 pipetas de 5 ml

5 pipetas de 2 ml

5 pipetas de 1 ml

50 tubos de ensayo grandes

- 1 soporte universal
- 2 buretas con llave de teflón de 50 ml
- 1 pinza para bureta doble
- 2 gradillas grandes
- 1 pizeta con agua destilada
- 1 escobillón
- 1 tina

Reactivos por equipo :

- 223 ml de urea 0.25 M
- 249 ml de solución buffer de fosfatos 0.05 M con pH = 7.2
- 11 ml de solución buffer de fosfatos 0.05 M con pH = 4.5
- 11 ml de solución buffer de fosfatos 0.05 M con pH = 6.0
- 11 ml de solución buffer de fosfatos con pH = 8.5
- 11 ml de solución buffer de fosfatos con pH = 10.0
- 30 ml de bicloruro de mercurio al 1%
- 14 ml de rojo de metilo
- 200 ml de HCl al 0.01 N

2.2.5.3 Efecto del pH en la actividad enzimática.

2.2.5.3.1 Objetivos específicos.

2.2.5.3.2 Procedimiento.

1. Colocar en las gradillas la siguiente serie de tubos de ensaye, que serán rotulados como "B-" para los blancos y "P-" para los problema:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
urea 0.25 M (ml)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
sol. buffer (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
sol. buffer pH	4.5	6.0	7.2	8.5	10	4.5	6.0	7.2	8.5	10
Hg Cl ₂ al 1% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-	-	-	-

2. Incubar a 50°C durante 5 minutos y agregar:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
extracto crudo (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

3. Incubar a 50°C durante 30 minutos y agregar: ³⁶

³⁶ Se sugiere preparar 1 tubo blanco y 1 tubo problema p. ej. B-1 y P-1 al mismo tiempo y dejar transcurrir 15 minutos para la siguiente pareja de tubos p. ej. B-2 y P-2, esto debido a que el producto de la reacción (hidróxido de amonio) es un agente muy volátil y es el que se mide al final de la práctica por medio de una titulación ácido-base.

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
HgCl ₂ al 1% (ml)	-	-	-	-	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

4. Transferir a matraces Erlenmeyer el contenido de cada tubo. Los matraces deben estar etiquetados bajo las mismas indicaciones que los tubos de ensaye; es decir: B-1, B-2, B-3; etc. para evitar confusiones.

5. Agregar a cada uno:

Matraces	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
rojo de metilo (gotas)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

6. Titular el contenido de cada uno de los matraces "B" y "P" con HCL 0.01 N hasta el virado a coloración **CANELA**.

7. Graficar pH vs. μmol de urea hidrolizada.³⁷

2.2.5.4 Efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática.

2.2.5.4.1 Objetivos específicos.

³⁷ Revisar el anexo A.1 de esta guía para el tratamiento de datos.

2.2.5.4.2 Procedimiento.

1. Colocar en las gradillas la siguiente serie de tubos de ensaye, que serán rotulados como "B-" para los blancos y "P-" para los problema:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
urea 0.25 M (ml)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
sol. buffer (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
sol. buffer pH	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
HgCl ₂ al 1% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-	-	-

2. Incubar por 5 minutos bajo las siguientes condiciones de temperatura:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
Temperatura (°C)	0	ambiente	50	80	0	ambiente	50	80

3. Agregar inmediatamente:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
extracto crudo (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

4. Incubar por 30 minutos bajo las siguientes condiciones de temperatura:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
Temperatura (°C)	0	ambiente	50	80	0	ambiente	50	80

5. Concluido el tiempo bajo éstas condiciones agregar:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
HgCl ₂ al 1% (ml)	-	-	-	-	0.5	0.5	0.5	0.5

6. Transferir el contenido de cada uno de los tubos de ensaye a matraces Erlenmeyer diferentes (previamente rotulados) y agregar:

Matraces	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
rojo de metilo (gotas)	3	3	3	3	3	3	3	3

7. Titular el contenido de cada uno de los matraces "B" y "P" con HCL 0.01 N hasta el virado a coloración CANELA.

8. Graficar Temperatura (T°) vs. μmol de urea hidrolizada.

2.2.5.5 Efecto del tiempo en la actividad enzimática.

2.2.5.5.1 Objetivos específicos.

2.2.5.5.2 Procedimiento.

1. Colocar en las gradillas la siguiente serie de tubos de ensaye, que serán rotulados como "B-" para los blancos y "P-" para los problema:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
urea 0.25 M (ml)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
sol. buffer (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
HgCl ₂ al 1% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-	-	-	-

2. Incubar a 50°C durante 5 minutos y agregar:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
extracto crudo (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

3. Incubar a 50°C durante por los siguientes lapsos de tiempo:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
tiempo (min)	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50

4. Concluído el tiempo de incubación agregar:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
HgCl ₂ al 1% (ml)	-	-	-	-	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

5. Transferir el contenido de cada uno de los tubos de ensaye a matraces Erlenmeyer diferentes (previamente rotulados) y agregar:

Matraces	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
rojo de metilo (gotas)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

6. Titular el contenido de cada uno de los matraces "B" y "P" con HCL 0.01 N hasta el virado a coloración **CANELA**.

7. Graficar tiempo (θ) vs. μmol de urea hidrolizada.

2.2.5.6 Efecto de la concentración de sustrato en la actividad enzimática.

2.2.5.6.1 Objetivos específicos.

2.2.5.6.2 Procedimiento.

1. Colocar en las gradillas la siguiente serie de tubos de ensaye, que serán rotulados como "B-" para los blancos y "P-" para los problema:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
urea 0.25.M (ml)	1.0	2.0	4.0	6.0	1.0	2.0	4.0	6.0
sol. buffer (ml)	8.0	7.0	5.0	3.0	8.0	7.0	5.0	3.0
HgCl ₂ al 1% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-	-	-

2. Incubar a 50°C durante 5 minutos y agregar:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
extracto crudo (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

3. Incubar a 50°C durante 30 minutos y agregar:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
HgCl ₂ al 1% (ml)	-	-	-	-	0.5	0.5	0.5	0.5

4. Transferir el contenido de cada uno de los tubos de ensaye a matraces Erlenmeyer diferentes (previamente rotulados) y agregar:

Matraces	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
rojo de metilo (gotas)	3	3	3	3	3	3	3	3

5. Titular el contenido de cada uno de los matraces "B" y "P" con HCL 0.01 N hasta el virado a coloración **CANELA**.

6. Graficar concentración de sustrato [S] vs. μmol de urea hidrolizada.

2.2.5.7 Efecto de la concentración de enzima en la actividad enzimática .

2.2.5.7.1 Objetivos específicos.

2.2.5.7.2 Procedimiento.

1. Colocar en las gradillas la siguiente serie de tubos de ensaye, que serán rotulados como "B-" para los blancos y "P-" para los problema:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
urea 0.25 M (ml)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
sol. buffer (ml)	5.2	5.1	5.0	4.9	5.2	5.1	5.0	4.9
HgCl ₂ al 1% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-	-	-

2. Incubar a 50°C durante 5 minutos y agregar:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
extracto crudo (ml)	0.3	0.4	0.5	0.6	0.3	0.4	0.5	0.6

3. Incubar a 50°C durante 30 minutos y agregar:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
HgCl ₂ al 1% (ml)	-	-	-	-	0.5	0.5	0.5	0.5

4. Transferir el contenido de cada uno de los tubos de ensaye a matraces Erlenmeyer diferentes (previamente rotulados) y agregar:

Matraces	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
rojo de metilo (gotas)	3	3	3	3	3	3	3	3

5. Titular el contenido de cada uno de los matraces "B" y "P" con HCL 0.01 N hasta el virado a coloración CANELA.

6. Graficar concentración de enzima [E] vs. μmol de urea hidrolizada.

2.2.5.8 Efecto de la concentración de inhibidor en la actividad enzimática.

2.2.5.8.1 Objetivos específicos.

2.2.5.8.2 Procedimiento.

1. Colocar en las gradillas la siguiente serie de tubos de ensaye, que serán rotulados como "B-" para los blancos y "P-" para los problema:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
urea 0.25 M (ml)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
sol. buffer (ml)	5.2	5.0	4.8	4.6	5.2	5.0	4.8	4.6
HgCl ₂ al 1% (ml)	0.3	0.5	0.7	0.9	-	-	-	-

2. Incubar a 50°C durante 5 minutos y agregar:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
extracto crudo (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

3. Incubar a 50°C durante 30 minutos y agregar:

TUBOS	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
HgCl ₂ al 1 % (ml)	-	-	-	-	0.3	0.5	0.7	0.9

4. Transferir el contenido de cada uno de los tubos de ensaye a matraces Erlenmeyer diferentes (previamente rotulados) y agregar:

Matraces	B-1	B-2	B-3	B-4	P-1	P-2	P-3	P-4
rojo de metilo (gotas)	3	3	3	3	3	3	3	3

5. Titular el contenido de cada uno de los matraces "B" y "P" con HCL 0.01 N hasta el virado a coloración **CANELA**.

6. Graficar Concentración del inhibidor [INH) vs. μmol de urea hidrolizada.

Capítulo 3 .

PRACTICA DEMOSTRATIVA No. 2

ENZIMA MODELO :

POLIFENOL OXIDASA.



3.1 Generalidades de la enzima.

3.1.1 Introducción.

Schoenbein³⁸ en 1856 fué la primera persona en describir una enzima en los hongos, la cual, en presencia de oxígeno, propiciaba la oxidación aeróbica de ciertos compuestos en las plantas. A partir de este descubrimiento, muchos investigadores se han interesado en el estudio de la enzima y su efecto o acción en los alimentos el cual genera obscurecimiento "enzimático" en algunos frutos, vegetales y crustáceos produciendo el pigmento negro "melanina".

3.1.2 Nombres sinónimos.

Inicialmente a la enzima polifenol oxidasa se le dió el nombre de oxigenasa, ya que su acción de obscurecimiento se iniciaba cuando el alimento tenía contacto con el oxígeno presente en el aire a través de sus tejidos internos cuando se cortaban.

Fué en 1937 cuando Kubowitz reemplazó el nombre de oxigenasa por el de fenolasa o polifenol oxidasa. Sin embargo, la polifenol oxidasa (PPO) es conocida también como tirosinasa ³⁹, monofenol oxidasa, polifenolasa, fenolasa, catecol oxidasa, catecolasa y cresolasa. ⁴⁰, ⁴¹ Estos nombres están basados en los tipos de reacción que cataliza la enzima.

³⁸ C. F. Schoenbein, *cit pos.*, J. R. Whitaker . *Principles of enzymology for ...* , p. 571.

³⁹ Nombre que se le dió porque se estudió la enzima utilizando como sustrato la tirosina.

⁴⁰ Jon s. Chen; Cheng - i Wei y Marty R. Marshall . *Inhibition mechanism of ...* , p. 1897

⁴¹ J. R. Whitaker . *Principles of enzymology for ...* , p. 571.

Su nombre sistemático es:

orto - difenol : Oxígeno oxidorreductasa

Sin embargo, algunos autores la denominan también como :

Monofenol dihidroxi - L - fenil alanina : oxígeno oxidorreductasa ⁴²

3.1.3 Número de clasificación.

La PPO es una enzima que en la actualidad muchos autores le conocen con el número de clasificación EC 1.10.3.1 ⁴³ y otros la clasifican bajo el número EC 1.14.18.1 ⁴⁴. Sim et al.⁴⁵ manejan a la polifenol oxidasa con ambas nomenclaturas (PPO; monofenol monooxigenasa EC 1.14.18.1 ó difenol : oxígeno oxidorreductasa EC 1.10.3.1. Al parecer la diferencia en nomenclatura, radica en el origen o fuente de obtención de la enzima.

3.1.4 Sustratos.

Las polifenol oxidasas obtenidas de diferentes fuentes difieren marcadamente en sus requerimientos de sustrato específico como se muestra en la tabla 3.1 para papa, durazno y hoja de frijol. ⁴⁶

⁴² Soledad Chazarra et al., Partial purification and characterization..., p. 984.

S. G. Burton et al., Activity of Mushroom..., p. 938.

⁴³ Entre estos autores destacan los siguientes enlistados en las referencias al final del Manual:

Shuji Fujita et al., Purification and properties of poliphenol oxidase in head..., p. 643.

B. K. Simpson; M.R. Marshall y W. S. Otwell, Phenol oxidase from shrimp..., p. 918.

⁴⁴ Las siguientes referencias están enlistadas al final del Manual :

S.G. Burton et al., Activity of Mushroom..., p. 938.

Soledad Chazarra et al., Partial purification and characterization..., p. 984.

J. S. Chen et al., Inhibitory effect of kojic..., p. 1396.

J. S. Chen; Cheng - i Wei y Marty R. Marshall, Inhibition mechanism of..., p. 1897

S. Kermasha, Mireille Goetghebeur y Alan Monfette, Studies on inhibition of ..., p. 526.

⁴⁵ S. K. Sim; S. M. Ohmann y C. B. S. Tong, Comparison of poliphenol oxidase in tuber ..., p. 1.

⁴⁶ J. R. Whitaker, op cit., p. 579.

Además de estos compuestos se ha reportado que también se han utilizado DOPA ⁴⁷ y algunos flavonoides ⁴⁸ como sustratos para la polifenol oxidasa.

TABLA 3.1 Especificidades relativas de sustrato de 3 diferentes polifenol oxidasas.

SUSTRATO	ACTIVIDAD	RELATIVA	AL CATECOL
	PAPA a) .	DURAZNO b) .	FRIJOL c) .
compuestos di- o trifenólicos			
- catecol	100	100	100
- 4 - metilcatecol		51.5	200-225
- d - catequín		31.8	
- ác. clorogénico	140	22.2	8
- ác. caféico	76.5	0	12.5
- ác. protocatecoico		16.3	0.11
- 3,4 - dihidroxi - l - fenil alanina	54.3	40.5	50
- dopamina		45.6	
- ác. gálico		25.7	0.22
- pirogalol			85-95
compuestos monofenólicos			
- p - cresol	5.5	0	4
- ác. p - comérico		0	0.05

a) A. R. Macrae y R. G. Duggleby, Phytochem. , 1968, 7 : 855 ; pH 7.0

b) T. C. Wong ; B. S. Luh y J. R. Whitaker, Plant Physiol. , 1971, 48 : 19; Para componente A de durazno Clingstone a pH 6.8 y 30 ° C.

c) D. A. Robb; T. Swain y L. W. Mapsoa, Phytochem. , 1966, 5 : 665.

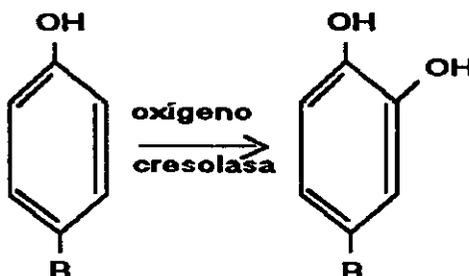
⁴⁷ J. S. Chen et al. , Inhibitory effect of Kojic acid... , p. 1396.

⁴⁸ Soledad Chazarra et al. , Partial purification and characterization... , p. 984.

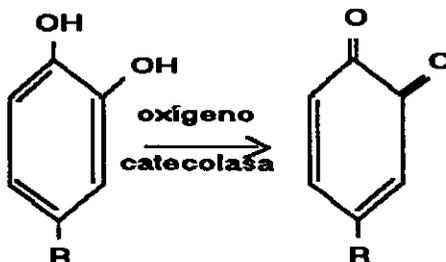
3.1.5 Reacciones enzimáticas involucradas.

A diferencia de muchas enzimas la PPO puede catalizar dos tipos diferentes de reacciones, ambas requieren compuestos fenólicos. Estas reacciones involucran:

1. La hidroxilación de monofenoles para dar orto-difenoles (teniendo actividad de cresolasa) y



2. La remoción de hidrógeno (oxidación) a partir de orto-difenol para dar una orto-quinona (teniendo actividad de catecolasa).



En un principio la doble actividad de la enzima representó un problema complejo para su estudio. En la actualidad, se sabe que la enzima existe de varias formas moleculares múltiples (isoenzimas) que no tienen la misma actividad relativa sobre los distintos sustratos ni tienen las mismas cantidades de cobre.

3.1.6 Sustancias de activación de la enzima.

La enzima puede ser liberada de ese estado de latencia y activada con una gran variedad de agentes entre los que se pueden mencionar los siguientes: ⁴⁹

Tabla 3.2 Relación de sustancias que activan la polifenol oxidasa.

SUSTANCIA ACTIVANTE	REFERENCIA COMPLETA
Shocks ácido-base	R. H. Kenten. "Latent phenolase in extracts of broad bean (<i>Vicia faba</i> L.) 1. Activation by acid and alcali.", <u>Biochem. J.</u> , 1957, 67 : 300-307.
Urea	T. Swain; L. W. Mapson y D. A. Robb. "Activation of <i>Vicia faba</i> L. tyrosinase as effected by denaturing agents", <u>Phytochem.</u> , 1966, 5 : 469-482.
Detergentes aniónicos como el SDS	W. H. Flurkey. "Polyphenol oxidase in higer plants. Immunological detection and analysis of in vitro translation products", <u>Plant Physiology</u> , 1986, 81 : 614-618. J. H. Golbeck y K. V. Cammarata. "Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of native chloroplast enzyme", <u>Plant Physiology</u> , 1981, 67 : 977-984. R. H. Kenten. "Latent phenolase in extracts of broad bean (<i>Vicia faba</i> L.) 1. Activation by anionic wetting agents", <u>Biochem. J.</u> , 1958, 68 : 244-251. A. Sánchez - Ferrer; F. Laveda y F. García - Carmona. "Substrate - dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactans", <u>J. Agric. Food Chem.</u> , 1993, 41 : 1583-1586.

Continúa ...

⁴⁹ Todas las referencias fueron citadas por Soledad Chazarra et al. . Partial purification and characterization ... , p. 984.

Continúa ...

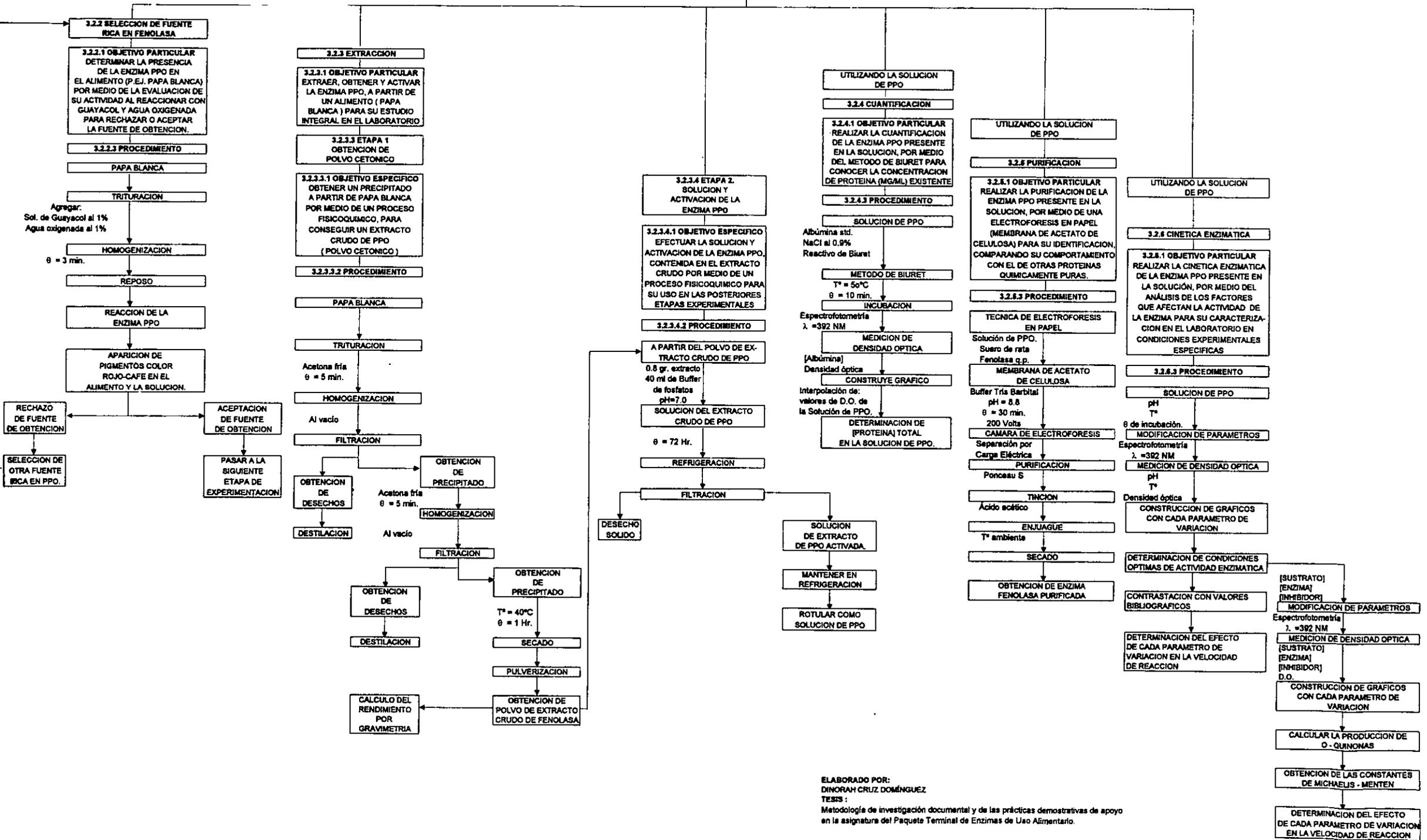
SUSTANCIA ACTIVANTE	REFERENCIA COMPLETA
Proteasas	<p>J. H. Golbeck y K. V. Cammarata . "Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of native chloroplast enzyme", <u>Plant Physiology</u> , 1981, 67 : 977-984.</p> <p>R. S. King y W. H. Flurkey."Effects of limited proteolysis on broad bean polyphenol oxidase", <u>J. Sci. Food Agric.</u> , 1987, 41 : 231-240.</p> <p>A. Sánchez - Ferrer; J. Villalba y F. García - Carmona. "Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase. <u>Phytochemistry</u> , 1989, 91 : 1321-1325.</p> <p>I. Soderhall y K. Soderhall. "Purification of polyphenol oxidase from <i>Daucuscarota</i> cell cultures", <u>Phytochemistry</u> , 1989 , 28 : 1805 -1808.</p>
Poliaminas	<p>M. Jiménez - Atienzar; M. A. Pedreño y F. García - Carmona. "Activation of polyphenol oxidase by poliamines", <u>Biochem. Int.</u> , 1991, 25 : 861- 868.</p>
Ácidos grasos	<p>J. H. Golbeck y K. V. Cammarata . "Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of native chloroplast enzyme", <u>Plant Physiology</u> , 1981, 67 : 977-984.</p> <p>S. W. Hutcheson y B. B. Buchanan. "Polyphenol oxidation by <i>Vicia faba</i> chloroplast membranes. Studies on the latent membrane-bound polyphenol oxidase and on the mechanism of photochemical polyphenol oxidation", <u>Plant Physiol.</u> , 1980, 66 : 1150-1154.</p>

3.2 Actividades propuestas para el estudio de la enzima Polifenol oxidasa.

- EXTRACCION
- CUANTIFICACION
- PURIFICACION
- CINETICA ENZIMATICA

3.2.1 Diagrama Metodológico.

ENZIMA FENOLASA



ELABORADO POR:
DINORAH CRUZ DOMÍNGUEZ
TESS :
Metodología de investigación documental y de las prácticas demostrativas de apoyo en la asignatura del Paquete Terminal de Enzimas de Uso Alimentario.

3.2.2 Selección de fuentes de obtención.

3.2.2.1 Objetivo particular.

Determinar la presencia de la enzima fenolasa (ppo) en el alimento, por medio de la evaluación de su actividad, al reaccionar con guayacol y agua oxigenada para rechazar o aceptar la fuente de obtención de fenolasa y continuar con la experimentación.

3.2.2.2 Material.

por equipo:

- 1 mortero con pistilo
- 1 navaja de 1 filo
- 2 pipetas de 5 ml.
- 3 vasos de precipitados de 25 ml.
- 1 varilla de vidrio
- 1 escobillón
- 1 espátula
- 1 tina

Reactivos por equipo:

- 10 gr. fuente de obtención de PPO (alimento)
- 6 ml. solución de guayacol al 1%

6ml. de agua oxigenada al 1%

3.2.2.3 Procedimiento.

1. Corte el alimento en pequeños trozos con ayuda de la navaja.
2. Coloque 5 gr. del material cortado en el mortero y trítúrelo un pococ con ayuda del pistilo.
3. Coloque el material machacado en un vaso de precipitados.
4. Adicione con una pipeta limpia 5 ml. de guayacol al 1%.
5. Adicione 5 ml de agua oxigenada al 1% como en el paso 4.
6. Mezcle perfectamente con ayuda de la varilla de vidrio, y déjelo reposar por 3 min.
7. Observe si se registra la presencia de cambio de color en el material machacado (alimento) y en la solución, y proceda a concluir si hay reacción de la enzima (positiva o negativa) con ayuda de la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Coloración que presenta la polifenol oxidasa al reaccionar con guayacol.

COLOR	REACCION
* Ningún cambio	NEGATIVA
* Manchas rojas en menos del 25% del material	POCO INDICATIVA
* Manchas rojas en más del 25% del material	POSITIVA TENUE
* Coloracion rojo-café en la superficie cortada y en la solución	POSITIVA

8. Efectúe la aceptación o rechazo del alimento para continuar la experimentación y argumente, ¿porqué si o porqué no?.

3.2.3 Extracción.

3.2.3.1 Objetivo particular.

Extraer, obtener y activar la enzima PPO, a partir de una alimento para su estudio integral en el laboratorio.

3.2.3.2 Material.

por equipo:

1 mortero con pistilo grande

1 matraz quitazato c/ alargadera y embudo

1 embudo

3 trozos de 6x6 cm de papel filtro whatman del No. 1

1 cristizador

1 varilla de vidrio

1 espátula

1 pizeta con agua destilada

1 escobillón

1 tina

por grupo:

1 balanza granataria

2 bombas de vacío c/mangueras

1 estufa

1 termómetro

1 garrafón para colocar filtrado de desechos c/tapa

algodón

Masking tape o tela adhesiva

1 frasco color ámbar

Reactivos por equipo:

61 ml de acetona fría

22 gr de papa blanca

40 ml de buffer de fosfatos pH=7.0 concentración 0.05 M.

0.8 gr. de extracto (polvo cetónico)

La extracción de la enzima fenolasa, requiere de dos etapas que son las siguientes:

ETAPA 1. Extracción con acetona para la obtención del polvo cetónico

ETAPA 2. Solución y activación de la enzima fenolasa (PPO) .⁵¹

⁵¹ Por límite de tiempo la ETAPA 2. de solución y activación se lleva a cabo fuera del horario de clase por el asesor de la asignatura.

3.2.3.3 Etapa 1. Obtención de polvo cetónico.

3.2.3.3.1 Objetivo específico.

Obtener un precipitado a partir de papa blanca, por medio de un proceso fisicoquímico para conseguir un extracto crudo de PPO o polvo cetónico.

3.2.3.3.2 Procedimiento.

1. Triturar 20.0 g de papa blanca en el mortero y agregarle 30 ml de acetona fría, mezclando ambos por espacio de 5 min. hasta obtener un homogenizado
2. Filtrar al vacío el homogenizado sobre papel whatman y recuperar el líquido filtrado del embudo en el garrafón para su destilación posterior.
3. El precipitado que quedó en el papel filtro, homogenizarlo nuevamente en el mortero con 25 ml de acetona fría por espacio de 5 min .
4. Filtrar nuevamente al vacío el homogenizado sobre papel whatman nuevo y recuperar el líquido filtrado del embudo en el garrafón para su destilación posterior. Rotular el garrafón con la siguiente información: asignatura, grupo, contenido y nombre del profesor.
5. Recuperar el precipitado del papel filtro en el cristalizador.
6. Dejar secar el precipitado ó polvo cetónico (extracto crudo) en la estufa por 1 Hr a 40°C.
7. Pulverizar el polvo cetónico en el mortero.

8. Pesar el pulverizado y calcular el rendimiento de la extracción por gravimetría.
9. Anote sus observaciones.

3.2.3.4 Etapa 2. Solución y activación de la enzima PPO.

3.2.3.4.1 Objetivo específico.

Efectuar la solución y activación de la enzima PPO. contenida en el polvo cetónico por medio de un proceso físico-químico para su uso en las posteriores etapas experimentales.

3.2.3.4.2 Procedimiento.

1. Disolver 0.8 gr. del extracto en 40 ml de buffer de fosfatos pH=7.0 , [0.05 M]
2. Dejar en refrigeración por 72 horas con agitación leve de la suspensión durante este período.
3. Filtrar en algodón la suspensión recolectando el filtrado en un frasco color ámbar previamente rotulado como se expuso en el paso No. 4 de la ETAPA 1, identificando su contenido como solución de PPO.
4. Anote sus observaciones.

3.2.4 Cuantificación.

3.2.4.1 Objetivo particular.

Realizar la cuantificación de la enzima Fenolasa (PPO) presente en la solución, por medio del método de Biuret para conocer la concentración de proteína total (mg/ml) existente.

3.2.4.2 Material.

por equipo:

2 gradillas metálicas

3 vasos de precipitado de 100 ml

21 tubos de ensaye grandes

1 termómetro

1 mechero bunsen

1 tripié

1 tela de asbesto

3 pipetas de 10 ml

3 pipetas de 5 ml

4 pipetas de 2 ml

4 pipetas de 1 ml

1 pizeta con agua destilada

1 tina

por grupo:

1 espectrofotómetro

1 celda para espectrofotómetro

1 vortex

Reactivos por equipo :

7 ml de solución standard de albúmina 5 mg / ml

1 ml de extracto crudo de fenolasa

40 ml de solución de NaCl al 0.9%

47 ml de reactivo de Biuret

3.2.4.3 Procedimiento.

1. Enumerar los tubos de ensaye de la siguiente forma: B, 1, 2, 3, 4, 5, 6, F.
2. Colocar en cada uno de los tubos de ensaye los reactivos en las cantidades que se especifican a continuación:

TUBOS	B	1	2	3	4	5	PPO
sol. std. de albúmina (ml)	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
extracto crudo de PPO (ml)	-	-	-	-	-	-	0.1
NaCl 0.9% (ml)	3.0	2.8	2.6	2.4	2.2	2.0	2.9
reactivo de Biuret (ml)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

3. Mezclar vigorosamente el contenido de los tubos por medio del vortex sin derramarlo .
4. Incubar durante 10 minutos los tubos de ensaye a 50°C en el baño María.
5. Efectuar la lectura de densidad óptica en el espectrofotómetro a 540 nm ó bien en el medidor Klett con el filtro verde.⁵²
6. Llevar a cabo el procedimiento anterior completo por duplicado.
7. Graficar concentración de albúmina vs. densidad óptica.
8. En la gráfica anterior obtener la concentración de la proteína presente en el extracto crudo por interpolación del dato de densidad óptica obtenido en la experimentación.
9. Reporte mg. de proteína por gramo de extracto.

⁵² Revisar el anexo A.2 para conocer el procedimiento de manejo del fotocolorímetro Klett Summerson o bien el anexo A.3 para el manejo del espectrofotómetro.

3.2.5 Purificación.

3.2.5.1 Objetivo particular.

Realizar la Purificación de la enzima PPO. presente en la solución por medio de una electroforesis en papel (membrana de acetato de celulosa) para su identificación, comparando su comportamiento con el de otras proteínas químicamente puras.

3.2.5.2 Material por grupo.

1 cámara de electroforesis

1 fuente de poder

10 imanes

1 caja de membranas de acetato de celulosa

2 tinas de tinción de vidrio con tapa

1 pinza

1 vidrio rectangular

1 vortex

5 tubos capilares

1 pipeta Pasteur con propipeta

1 vidrio de 15 x 10 ó de 15 x 15

2 tinas

1 escobillón

1 pizeta

toallas de papel estrasa (las necesarias)

Reactivos:

- 50-100 ml rojo de Ponceau o Ponceau S al 1% en ácido acético.
- 1 Lt buffer de Tris barbital a pH = 8.8 o de boratos al 0.005 M. o la cantidad que se requiera para el tipo de cámara de electroforesis que se utilice.
- 250 ml. ác. acético al 5 % por cada membrana a enjuagar
- 1 ml. ó 2 gotas suero de rata
- 1 ml. ó 2 gotas extracto crudo de PPO en solución
- 1 ml. ó 2 gotas fenolasa q.p.
- 3 ml alcohol absoluto.

3.2.5.3 Procedimiento.

1. Con mucho cuidado, marcar con un lápiz de manera muy tenue la membrana de acetato de celulosa en el centro (que será la zona de aplicación) y en las orillas la dirección del ánodo y el cátodo, procurando que la membrana no toque ninguna superficie y que tampoco se tome con los dedos.
2. Llenar la cámara de electroforesis con la solución amortiguadora; es decir, la solución de buffer de Tris barbital a pH = 8.8.
3. Sumergir con ayuda de la pinza la membrana de acetato de celulosa en la solución

amortiguadora e inmediatamente sacarla y escurrirla.

4. Bajo la asesoría del profesor, colocar la membrana en la cámara de electroforesis y extenderla sin romperla de manera firme con ayuda de los imanes.
5. Colocar una gota de suero de rata con el tubo capilar en la zona de aplicación al centro de la membrana.
6. Proceder de igual forma con la fenolasa q.p. y extracto crudo de fenolasa en solución, manejando entre cada gota, una distancia de aproximadamente 1 cm como se muestra en la figura Fig. 3.3
7. Colocar la tapa a la cámara de electroforesis y proceder a su conexión a la fuente de poder.⁵³
8. Realizar la purificación a 200 voltios por 30 min.
9. Desconectar la cámara de la fuente de poder y destapar.
10. Retirar con la pinza la membrana de acetato de celulosa y colocarla en la tina de tinción que contiene rojo de Ponceau, dejándola reposar durante 10 min.
11. Escurrir y colocar la membrana en la tina con ác. acético para sus enjuagues.
12. Dejar secar a la intemperie, sobre un vidrio limpio y desengrasado con alcohol absoluto.
13. Anote sus observaciones.

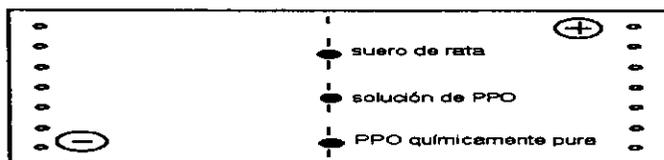


Fig. 3.1 Representación de membrana de acetato de celulosa.

⁵³ Tener extrema precaución en el manejo de la cámara al estar ya conectada por manejarse alto voltaje para la técnica de purificación.

3.2.6 Cinética enzimática.

3.2.6.1 Objetivo particular.

Realizar la cinética enzimática de la enzima fenolasa presente en la solución, por medio del análisis de los factores que afectan la actividad de la enzima para su caracterización en el laboratorio en condiciones de experimentación específicas.

3.2.6.2 Material.

por equipo:

- 3 vasos de precipitado de 100 ml
- 2 vasos de precipitado de 500 ml
- 2 vasos de precipitado de 250 ml
- 1 termómetro
- 1 mechero bunsen
- 1 telas de asbesto
- 1 tripiés
- 5 pipetas de 10 ml
- 5 pipetas de 5 ml
- 5 pipetas de 2 ml
- 5 pipetas de 1 ml
- 30 tubos de ensaye grandes
- 2 gradillas grandes

1 pizeta

1 escobillón

1 tina

por grupo:

2 espectrofotómetros longitud visible

4 celdas para espectrofotómetro

1 vortex

Reactivos por equipo:

34 ml extracto de PPO en solución

44 ml catecol al 0.1 %

220 ml solución buffer de fosfatos de pH = 7.0

9 ml solución buffer de fosfatos de pH = 5.0

9 ml solución buffer de fosfatos de pH = 6.0

9 ml solución buffer de fosfatos de pH = 8.0

9 ml solución buffer de fosfatos de pH = 10.0

65 ml sulfito de sodio al 1%

3.2.6.3 Efecto del pH en la actividad enzimática.

3.2.6.3.1 Objetivos específicos.

3.2.6.3.2 Procedimiento.

1. Colocar en una gradilla, una serie de tubos de ensaye (previamente rotulados) y agregar las siguientes sustancias, como se muestra a continuación:

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
buffer de fosfatos (ml)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
pH	5	6	7	8	10	5	6	7	8	10
extracto de PP0 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
catecol al 0.01% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
inhibidor Na ₂ SO ₄ al 1% (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-	-	-	-	-

2. Agitar vigorosamente y dejar reposar por espacio de 10 min. la mezcla.
3. Transcurrido el tiempo señalado, agregar :

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
inhibidor										
Na ₂ SO ₄ al 1% (ml)	-	-	-	-	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

4. Agitar vigorosamente los tubos " P-"
5. Colocar en una celda para espectrofotómetro 2ml del tubo B-1 y proceder a la lectura de densidad óptica a 392 nm.
6. Proceder como en el paso No. 5 con el tubo P-1.
7. Efectuar paso 5 y 6 con todos los tubos P- y B-.
8. Graficar pH vs. Densidad óptica.

3.2.6.4 Efecto de la Temperatura en la actividad enzimática.

3.2.6.4.1 Objetivos específicos.

3.2.6.4.2 Procedimiento.

1. Colocar en una gradilla, una serie de tubos de ensaye (previamente rotulados) y agregar las siguientes sustancias, como se muestra a continuación:

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
buffer de fosfatos (ml)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
extracto de PP0 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
catecol al 0.01% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
inhibidor Na ₂ SO ₄ al 1% (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-	-	-	-	-

2. Agitar vigorosamente e incubar por espacio de 10 min. lbajo las siguientes condiciones

de Temperatura :

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
T°x 10'' (°C)	0	20	40	50	60	0	20	40	50	60

3. Transcurrido el tiempo señalado, agregar :

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
inhibidor										
Na ₂ SO ₄ al 1% (ml)	-	-	-	-	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

4. Agitar vigorosamente los tubos " P-"

5. Colocar en una celda para espectrofotómetro 2ml del tubo B-1 y proceder a la lectura de densidad óptica a 392 nm.

6. Proceder como en el paso No. 5 con el tubo P-1.

7. Efectuar paso 5 y 6 con todos los tubos P- y B-.

8. Graficar Temperatura vs. densidad óptica.

3.2.6.5 Efecto del tiempo en la actividad enzimática.

3.2.6.5.1 Objetivos específicos.

3.2.6.5.2 Procedimiento.

1. Colocar en una gradilla, una serie de tubos de ensaye (previamente rotulados) y agregar las siguientes sustancias, como se muestra a continuación:

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
buffer de fosfatos (ml)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
extracto de PP0 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
catecol al 0.01% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
inhibidor Na ₂ SO ₄ al 1% (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-	-	-	-	-

2. Agitar vigorosamente y dejar reposar los tubos con la mezcla a temperatura ambiente

bajo las siguientes condiciones de tiempo :

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
reposo (min)	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25

3. Transcurrido el tiempo señalado, agregar :

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
inhibidor										
Na ₂ SO ₄ al 1% (ml)	-	-	-	-	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

4. Agitar vigorosamente los tubos " P-"
5. Colocar en una celda para espectrofotómetro 2ml del tubo B-1 y proceder a la lectura de densidad óptica a 392 nm.
6. Proceder como en el paso No. 5 con el tubo P-1.
7. Efectuar paso 5 y 6 con todos los tubos P- y B-.
8. Graficar tiempo (θ) vs. densidad óptica.

3.2.6.6 Efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de reacción.

3.2.6.6.1 Objetivos específicos.

3.2.6.6.2 Procedimiento.

1. Colocar en una gradilla, una serie de tubos de ensaye (previamente rotulados) y agregar las siguientes sustancias, como se muestra a continuación:

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
buffer de fosfatos (ml)	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0
extracto de PP0 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
catecol al 0.01% (ml)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
inhibidor Na ₂ SO ₄ al 1% (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-	-	-	-	-

2. Agitar vigorosamente y dejar reposar por espacio de 10 min. a temperatura ambiente.

3. Transcurrido el tiempo señalado, agregar :

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
inhibidor Na ₂ SO ₄ al 1% (ml)	-	-	-	-	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

4. Agitar vigorosamente los tubos " P-"

5. Colocar en una celda para espectrofotómetro 2 ml del tubo B-1 y proceder a la lectura de densidad óptica a 392 nm.

6. Proceder como en el paso No. 5 con el tubo P-1.

7. Efectuar paso 5 y 6 con todos los tubos P- y B-.

8. Graficar Concentración de Sustrato [S] vs. densidad óptica.

3.2.6.7 Efecto de la concentración de enzima en la velocidad de reacción.

3.2.6.7.1 Objetivos específicos.

3.2.6.7.2 Procedimiento.

- Colocar en una gradilla, una serie de tubos de ensayo (previamente rotulados) y agregar las siguientes sustancias, como se muestra a continuación:

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
buffer de fosfatos (ml)	4:3	4:1	4:0	3:8	3:6	4:3	4:1	4:0	3:8	3:6
extractor de PPO (ml)	0:2	0:4	0:6	0:7	0:9	0:2	0:4	0:5	0:7	0:9
catecol al 0.01% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

inhibidor Na ₂ SO ₄ al 1% (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-	-	-	-	-
--	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	---	---	---

2. Agitar vigorosamente e incubar por espacio de 10 min. a temperatura ambiente.

3. Transcurrido el tiempo señalado, agregar :

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
inhibidor Na ₂ SO ₄ al 1% (ml)	-	-	-	-	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

4. Agitar vigorosamente los tubos " P-"

5. Colocar en una celda para espectrofotómetro 2ml del tubo B-1 y proceder a la lectura de densidad óptica a 392 nm.

6. Proceder como en el paso No. 5 con el tubo P-1.

7. Efectuar paso 5 y 6 con todos los tubos P- y B-.

8. Graficar Concentración de Enzima [E] vs. densidad óptica.

3.2.6.8 Efecto de la concentración de inhibidor en la velocidad de reacción.

3.2.6.8.1 Objetivos específicos.

3.2.6.8.2 Procedimiento.

- Colocar en una gradilla, una serie de tubos de ensaye (previamente rotulados) y agregar las siguientes sustancias, como se muestra a continuación:

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
buffer de fosfatos (ml)	4:8	4:6	4:0	3:8	3:6	4:8	4:6	4:0	3:8	3:6
extracto de PPO (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
catecol al 0.01% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Inhibidor Na_2SO_4 al 1% (ml)	0:2	0:4	1:0	1:2	1:4					

- Agitar vigorosamente y dejar reposar por espacio de 10 min. a Temperatura ambiente.
- Transcurrido el tiempo señalado, agregar :

Tubos	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
Inhibidor Na_2SO_4 al 1% (ml)						0:2	0:4	1:0	1:2	1:4

4. Agitar vigorosamente los tubos " P-"
5. Colocar en una celda para espectrofotómetro 2ml del tubo B-1 y proceder a la lectura de densidad óptica a 392 nm.
6. Proceder como en el paso No. 5 con el tubo P-1.
7. Efectuar paso 5 y 6 con todos los tubos P- y B-.
8. Graficar Concentración de Inhibidor [inh] vs. densidad óptica.

Capítulo 4.

PRACTICAS DEMOSTRATIVAS

FUTURAS.



4.1 Propuestas a futuro utilizando los nuevos recursos.

4.1.1 Optimización de las etapas de extracción y purificación de una enzima.

Obtener una enzima purificada es un tema muy interesante ya que no solamente contempla el proceso para la purificación de la enzima, sino también de la evaluación de este procedimiento para hacerlo rentable, con un alto rendimiento y eficiencia.

Para la modernización de este proceso, se cuenta con el siguiente equipo:

- 1 Microcentrifuga de mesa Appendo RF, RMC-14 con sistema de refrigeración.
- 1 Equipo de electroforesis vertical Bio-Rad Modelo Protean
- 1 Equipo de electroforesis Bio-Rad, Trans-Blot-Cel.
- 1 Equipo de mini electroforesis Life Technology
- 1 Equipo para elución de proteínas a partir de geles Modelo GE-200, programable
- 1 Cámara digital Kodak para el estudio de geles de electroforesis
- Reactivos para el montaje de las técnicas
- Micropipetas Lab systems esterilizables

La Centrifuga fue adquirida para la separación sólido / líquido de los medios de crecimiento en la recuperación de enzimas intracelulares y extracelulares.

Los equipos de electroforesis permitirán desarrollar la purificación de la enzima y su caracterización.

El equipo para la elución de proteínas se utilizará para complementar la caracterización de la enzima de una forma más fina.

El equipo de electroforesis se complementa con la cámara digital; que con ayuda de un software, servirá para la interpretación de diferentes geles de electroforesis y permitirá un seguimiento adecuado durante las prácticas demostrativas que se desarrollarán.

Esta etapa cuenta también para su implementación, con suficientes reactivos; necesarios para efectuar el estudio de enzimas.

Además se adquirió Micropipetas esterilizables para efectuar una toma de muestras más exacta.

4.1.2 Cinética de desnaturalización y evaluación de tiempo de vida media de una enzima.

Dos ejemplos de prácticas demostrativas que se contmpla desarrollar son:

- 1) " Determinar la Temperatura bajo la cual una enzima, viable de ser utilizada en la Industria Alimentaria, presente desnaturalización térmica ".
- 2) " Establecer el tiempo de vida media y de las mejores condiciones de actividad enzimática de una enzima viable de ser utilizada en procesos de tecnología de alimentos ".

Con estas dos propuestas el alumno tendrá que aplicar sus conocimientos de cinética enzimática y la oportunidad de seleccionar la enzima que el considere de importancia para la industria alimentaria.

Los recursos adquiridos para el desarrollo de estas dos prácticas demostrativas son:

1 Espectrofotómetro Varian Cary 1 que incluye:

1 Computadora

1 Impresora a color

1 Soporte para sonda - software de Cinética Enzimática

1 Software de Bioquímica

1 Extensión o compartimiento para muestras

1 Block termostato con rango de control de Temperatura de 0 - 100 ° C.

El Espectrofotómetro Varian Cary 1 apoyará la actividad experimental sobre la evaluación de la actividad y Cinética de las enzimas. El equipo permite controlar y variar en su interior la Temperatura a la cual se desea hacer el estudio y también permite establecer el tiempo en el que se desea realizar la lectura y registro de los parámetros deseados.

Este aparato cuenta con un equipo de cómputo e impresora a color; además de un soporte de software para el desarrollo de la Cinética enzimática y otro software de Bioquímica. El software de Cinética enzimática está diseñado para proporcionar información sobre parámetros como pH, Temperatura óptima, Temperatura de desnaturalización, tiempo de vida media, constantes de Michaelis, efecto de catalizadores

en la cinética e igualmente el efecto de inhibidores, etc.; permitiendo la construcción de gráficos con los valores obtenidos.

Además se adquirió:

8 celdas rectangulares para muestras

1 Medidor de pH marca Hanna que puede utilizarse a Temperaturas entre el rango de 10 a 125 ° C, el cual controla el pH del medio en que se desarrolla la reacción y también puede utilizarse en la preparación de las soluciones y reactivos que requieran un pH determinado.

Otro equipo que es indispensable para todos estos proyectos que no ha sido mencionado, pero que es importante, es un refrigerador sin el cual, las muestras de enzimas, las soluciones y los reactivos necesarios para las técnicas y que requieren estar en refrigeración podrían sufrir alteraciones o descomposición durante la fase experimental, conduciendo a un desperdicio de materiales.

La aplicación y utilidad de estos recursos no se limitará a las dos propuestas anteriormente mencionadas ya que existen una gran variedad de alternativas de estudio que pueden desarrollarse y en la que se puede incursionar. Por el momento son dos ejemplos de mejora en la asignatura.

Por ello, se contempla que el alumno podrá diseñar y realizar sus proyectos de investigación con el uso de estos recursos y se considerarán como alternativa para su titulación a nivel licenciatura.

4.2.3 PCR : Técnica que puede ser utilizada en la industria alimentaria.

La técnica PCR , cuyas siglas significan Reacción en cadena de la polimerasa, lleva a cabo la amplificación de un pequeño segmento de DNA *in vitro* para después realizar la producción de grandes cantidades de ese fragmento específico del DNA en un lapso de tiempo muy corto, donde la TAQ DNA-polimerasa, juega un papel muy importante.

Esta técnica es una herramienta que en los últimos años ha tomado mucho auge por su utilidad en el análisis de la estructura de DNA y RNA, para su implementación en otras técnicas de genética molecular de numerosos diagnósticos aplicados en la medicina clínica y forense. Un ejemplo de su aplicación es en el estudio del virus del SIDA.

Pero su campo de aplicación no sólo se restringe a su uso en éstas áreas, sino que también puede apoyar a la Industria Alimentaria.

Un ejemplo de su utilidad puede ser en el Control de Calidad de numerosos productos como las hamburguesas, susceptibles de ser adulteradas al mezclar carne de cerdo con carne de res en su preparación; procedimiento que se realiza para abatir costos en la Materia prima.

Otra aplicación sería la detección de microorganismos patógenos en los alimentos. El estudio y caracterización de su DNA; evitando enfermedades a los consumidores.

Con esta visión , en el Paquete Terminal se cuenta ya con los recursos necesarios para su implementación en nuevas prácticas demostrativas que serán enfocadas a la

propuesta de mejoras en la industria alimentaria. El equipo y reactivos necesarios para montar la técnica de PCR son:

1 Termociclador Modelo 24000

1 Kit PCR para el desarrollo de la Técnica que incluye:

- Enzima Taq. DNA-polimerasa
- Buffer DNTPS
- Mg⁺⁺

1 Marcador de Peso 100 HP-Ladder, 250 VG

Reactivos necesarios para la Técnica.

De este material, el Termociclador es el lugar donde se efectúa la reacción en cadena para la amplificación del segmento de DNA.

La Taq. DNA-polimerasa es la enzima que se encarga de efectuar la síntesis del DNA a partir de la muestra.

El procedimiento se efectúa en varios ciclos y se termina hasta que se tiene el suficiente material genético deseado, para su identificación y caracterización posterior.

En breve los asesores desarrollarán los procedimientos básicos para el manejo de los equipos mencionados; e iniciar así, una moderna línea de prácticas demostrativas que puedan ser ofrecidas a los alumnos del Paquete Terminal de Enzimas la cual sea atractiva y de vanguardia.

4.3 Descripción y uso de material audiovisual para el apoyo en la asignatura.

La modernización de la asignatura también abarca el aspecto Teórico con la adquisición de un sistema de soporte didáctico que consta de un equipo de video y fotografía que incluye:

- 1 Videocámara VHS Panasonic
- 1 videgrabadora VHS Sony
- 1 retroproyector de acetatos Dukane
- 1 Televisión Sony Modelo KV.
- 1 cámara fotográfica Nikon Modelo F-601.

El equipo será utilizado para el registro audiovisual de las labores que sean desarrolladas durante el Curso y para el registro también de las visitas a diferentes Instituciones donde se realizan estudios de Biotecnología.

Su implementación permitirá analizar con más tiempo y detalle todo el material filmado y fotografiado.

También se contará con un equipo de cómputo que consta de:

- 1 Computadora Lanix Multimedia
- 1 Computadora Acer Pentium
- 1 Impresora Laser Hewlett Packard SL.

Estas computadoras serán utilizadas por los alumnos para que recopilen y archiven todo el material informativo que se vaya generando, así como de las visitas a Centros de Investigación de Biotecnología.

La adquisición de la computadora con Multimedia está pensada también como elemento de apoyo para la investigación documental en bases de datos que estén relacionadas a la asignatura; y se contempla también su conexión a futuro con Internet para la búsqueda de información más actualizada.

Ambas computadoras servirán para apoyar a los alumnos que deseen titularse y realizar trabajos de tesis de sobre Biotecnología enzimática, asesorados por los profesores que imparten la asignatura del Paquete Terminal.

También se utilizarán las computadoras para modernizar el proceso de recopilación y almacenamiento de material didáctico que se genera en los Cursos para su posterior evaluación y mejora.

Conclusiones.

Este trabajo cumple con los objetivos descritos al proporcionar una guía que contiene material necesario para el desarrollo de las actividades planeadas para la enseñanza de la asignatura.

Con el desarrollo de este trabajo se proporciona al alumno un acercamiento a la asignatura, al describir la estructura de enseñanza bajo la cual se ha definido el curso. Esto le permite decidir a tiempo si la opción que ha elegido cubre sus expectativas de formación terminal bajo el rubro de la Biotecnología enzimática.

Igualmente le proporciona una herramienta muy útil para reforzar su metodología de investigación documental al realizar un proyecto. Con esta información y ejercicios, el alumno realiza con detalle y de forma ágil su investigación y la entrega en un reporte escrito serio y formal.

Las prácticas demostrativas que complementan el aspecto teórico de la asignatura son herramientas de apoyo que cumplen adecuadamente la finalidad bajo la cual fueron diseñadas y que es el reforzar el aprendizaje por los alumnos en los aspectos básicos del estudio de las enzimas.

El logro por parte de ellos para la obtención de equipo tan avanzado implica un enfoque vanguardista y variado del amplio panorama de investigación que ofrece la Biotecnología.

Este proceso conllevará al desarrollo de nuevo material didáctico basado en los nuevos equipos, presentando nuevos procedimientos que se irán desarrollando. El alcance de éstos será en función de una buena orientación y metodología de investigación y que es lo que se ha brindado en esta primera etapa de evolución del Curso del Paquete Terminal de Enzimas de Uso Alimentario.

Recomendaciones.

Aunque estas prácticas demostrativas no manejan enzimas de interés alimentario, pueden ser una base para el diseño de nuevas prácticas demostrativas por parte de los alumnos.

La nueva proyección que se le dará al aspecto práctico demostrativo del Paquete Terminal de Enzimas de Uso Alimentario, es una labor atractiva y ambiciosa que se realizará con el fin de que los alumnos se interesen en orientar su desarrollo profesional hacia la Biotecnología de Enzimas. Su implementación será realizada en breve por los Asesores que imparten la Asignatura.

Bibliografía.



Bibliografía consultada.

CAPITULO 1.

- 1.- **ALMANZA MORALES**, José Luis y Minerva del Ángel Santillán. **Ven y utiliza los recursos de tu biblioteca** .-- 4 ed. -- México : UNAM , Dirección General de Bibliotecas , 1995 . *** p.
- 2.- **BAENA PAZ**, Guillermina. **Instrumentos de investigación : tesis profesionales y trabajos académicos** .-- 13 ed. -- México : Editores Mexicanos Unidos , 1987 . 134 p.
- 3.- **CAZARES HERNANDEZ**, Laura ... **et al. Técnicas actuales de Investigación documental** .-- 3 ed.-- México : Trillas : UAM , 1992 . 194 p.
- 4.- **TORRE VILLAR**, Ernesto de la y Ramiro Navarro de Anda. **Metodología de la investigación bibliográfica, archivística y documental** .-- México : McGraw-Hill , 1985 . 298 p.

CAPITULO 2.

- 5.- **ALBERTY**, Robert A. **Advances in enzymology** .-- Interscience Publishers , vol. 17. 58-61 p.
- 6.- **ATKINSON**, B. ; J. Rott e I. Rousseau. " Characteristics of unbuffered gel-immobilized urease particles. I. Internal pH "; **Biotechnology and bioengineering** , 1977 , **19** (7) : 1037-1063.

- 7.- **DUMITRIU**, Severian ; Marcel Popa ; Vlad Artenie y Florin Dan. " Bioactive polymers. 56: Urease immobilization on carboxymethylcellulose "; **B. B.** , 1989 , **34**(3) : 283-390.
- 8.- **MINAMOTO**, Yoshiki y Yasumi Yugari. " Polymethylglutamate as a new matrix for covalently immobilized enzymes : preparation and properties of urease and uricase "; **B. B.** , 1980 , **22**(6) : 1225-1235.
- 9.- **RAGHUNATH**, K. ; K. Panduranga Rao y Joseph K. Thomas. "Preparation and characterization of urease immobilized on to collagen-poly(glycidyl methacrylate) graft copolymer "; **B. B.** , 1984 , **26**(1) : 104-109.
- 10.- **RAI**, Ashwani Kumar. " Purification and properties of urease from a cyanobacterium *Anabaena doliolum* "; **FEMS Microbiology Letters** , 1989 , **61**(3) : 319-322.
- 11.- **TODD**, Matthew J. y Robert P. Hausinger. " Purification and characterization of the nickel-containing multicomponent urease from *Klebsiella aerogenes* "; **The Journal of Biological Chemistry** ; 1987 , **262**(13) : 4963-5967.

CAPITULO 3.

- 12.- **CHAZARRA**, Soledad ; Juana Cabanes ; Josefa Escribano y Francisco García-Carmona. " Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Latuca sativa* L.) "; **J. Agric. Food Chem.** , 1996 , **44** : 984-988.
- 13.- **CHEN**, Jon S. ... et al. " Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases "; **J. Agric. Food Chem.** , 1991 ,

39(11) : 1396-1401.

- 14.- CHEN, Jon S. ; Cheng-i Wei y Marty Marshall. " Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase "; J. Agric. Food Chem. , 1991 ,
39(11) : 1897-1901.

ANEXOS

- 15.- CAMPOS CALTENCO, Grisel ... et al. Manual de bioquímica celular .-- México : UNAM , FESC , 1993 . 97 p.
- 16.- MONDRAGON MILLAN, Luis Antonio. Manual del paquete terminal de enzimas de uso alimentario .-- México. 1993. Tesis, Ingeniería en Alimentos, UNAM , FESC . 247 p.
- 17.- PEARSON, D. Técnicas de laboratorio para el análisis de los alimentos / tr. C. Romero y J. L. Miranda.-- Zaragoza, España : Acribia, 1981 . 331 p.

Bibliografía recomendada.

BIBLIOGRAFÍA DE SEGUNDA MANO PARA EL CAPÍTULO 1.

GONZÁLEZ REYNA, Susana. Manual de redacción e investigación

documental .-- 4 ed.-- México : Trillas , 1991 . 204 p.

HUASCAR TABORGA. La tesis de grado : técnica de elaboración .-- La

Paz, Bolivia : Los Amigos del Libro , 1966. 257 p.

NAGHI NAMAUFOROOSH, Mohammad. Metodología de la investigación

en administración .-- México : LIMUSA , 1989 . 531 p.

BIBLIOGRAFIA DE PRIMERA MANO PARA EL CAPITULO 2.

ATKINSON, B. ; J. Rott e I. Rousseau. " Characteristics of unbuffered gel-

immobilized urease particles. II. Internal pH " ; Biotechnology and

bioengineering , 1977 , 19 (7) : 1065-1086.

BOLLMEIER, John Philip y Stanley Middleman. " Hidrolysis of urea by gelatin -

immobilized urease : separation of kinetic and diffusion phenomena in a

model immobilized - enzyme reactor system " ; Biotechnology and

bioengineering , 1979 , 21(12) : 2303-2321.

BOYD, Stephen A. y Max M. Mortland. " Urease activity on a clay - organic

complex " ; Soil Sci. Soc. Am. J. , 1985 , 49 : 619-622.

BURESH, R.J. ; S. K. De Datta ; J. L. Padilla y M. I. Samson. " Effect of two

urease inhibitors on floodwater ammonia following urea application to

lowland rice "; Soil Sci. Soc. Am. J. , 1988 , 52 : 856-861.

CHE MAN, Y.B. ; L. S. Wei ; A. I. Nelson y N. Yamashita. " Effects of soaking soybeans in dilute acids on biologically active components "; JAOCS , 1991 , 68(7) : 471-473.

DEMIREL, Günay ; Güneri Akovali ; Abdurrahman Tanyolac y Nesrin Hasirci. "A comparative study of solid supported and soluble urease for the enzymatic hydrolysis of urea "; J. Chem. Tech. Biotechnol. , 1992 , 55 : 319-123.

GOOS, R. J. " Division s-8-fertilizer technology and use : identification of ammonia thiosulfate as a nitrification and urease inhibitor "; Soil Science Society of American Journal , 1985 , 49 : 232-235.

HUANG, Ting-Chia y Dong-Hwang Chen. " Kinetic study of urease-catalysed urea hydrolysis ", J. Chem. Tech. Biotechnol. , 1991 , 52 : 433-444.

----- " A study on the removal of urea from aqueous solution with immobilized urease and electrodialysis"; J. Chem. Tech. Biotechnol. , 1992 , 55 : 191-199.

----- " Variations of ammonium ion concentration and solution pH during the hydrolysis of urea by urease "; J. Chem. Tech. Biotechnol. , 1992 , 55 : 45-51.

----- " Kinetic studies on urea hydrolysis by immobilized urease in a batch squeezer and flow reactor "; B.B. , 1992 , 40(10) : 1203-1209.

IYENGAR, Leela y A.V.S. Prabhakara Rao. " Urease bound with chitin with glutaraldehyde "; B. B. , 1979 , 21(8) : 1333-1343.

KAKIMOTO, Shigeya ; Yasuhiro Sumino ; Shun-ichi Akiyama y Yoshio Nakao.

"Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus reuteri*";

Agric. Biol. Chem., 1989, **53**(4) : 1119-1125.

KATYAL, J. C. ; Bijay Singh ; P. L. G. Vlek y R. J. Buresh. " Efficient nitrogen use as affected by urea application and irrigation sequence "; **Soil Sci. Soc. Am. J.**, 1987, **51** : 366-370.

KRAJEWSKA, Barbara. " Urease immobilized on chitosan membrane, inactivation by heavy metal ions "; **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, 1991, **52** : 157-162.

MIYAMA, Hajime ; Takaomi Kobayashi y Yoshio Nosaka. " Immobilization of urease on synthetic polymers "; **B. B.**, 1982, **24** : 2757-2763.

—. " Immobilization of enzyme on nylon containing pendant quaternized amine groups "; **B. B.**, 1984, **26** : 1390-1392.

MOYNIHAN, C.K. ... et al. " Urea hydrolysis by immobilized urease in a fixed-bed reactor : analysis and kinetic parameter estimation "; **B. B.**, 1989, **34**(7) : 951-963.

SCHMIDT-STEFFEN, Alfred y Eberhard Staude. " Ultrafiltration membranes for chemical handling of urease "; **B. B.**, 1992, **39**(7) : 725-731.

SHEMER, Lev ... et al. " Multilayer immobilized-enzyme filter reactors : urease bound to nylon fabric filters "; **B. B.**, 1979, **21**(9) : 1607-1627.

THOMAS, C.R. y P. Dunnill. " Action of shear on enzymes : studies with catalase and urease "; **B. B.**, 1979, **21** (12) : 2279-2302.

VASUDEVAN, P. T. ; L. Ruggiano y R. H. Weiland. " Studies on the deactivation of immobilized urease "; **B. B.**, 1990, **35**(11) : 1145-1149.

YAMAZAKI, Eiichirou ... et al. " Characteristics of acid urease from

Streptococcus mitior "; **Agric. Biol. Chem.** , 1990 , **54**(9) : 2433-2435.

BIBLIOGRAFIA DE PRIMERA MANO PARA EL CAPÍTULO 3.

BURTON, Stephanie G. ; John R. Duncan ; Perry T. Kaye y Peter D. Rose.

"Activity of mushroom polyphenol oxidase in organic medium " ;

Biotechnology and bioengineering , 1993 , **42**(8) : 938-944.

CHEN, J. S. ; R. S. Rolle, M.R. Marshall y C. I. Wei. " Comparison of

phenoloxidase activity from florida spiny lobster and western australian

lobster"; **J. Food Sci.** , 1991 **56** : 154-160.

CHEYNIER, Véronique y Jorge M. Ricardo da Silva. " Oxidation of grape

procyanidins in model solutions containing *trans*-caffeoyltartaric acid and

polyphenol oxidase "; **J. Agric. Food Chem.** , 1991 , **39**(6) : 1047-1049.

CHILAKA, Ferdinand C. ; Emmanuel O. Anosike y Patrick C. Egbuna,

" Purification and properties of polyphenol oxidase from oil bean

(*Pentaclethra macrophylla* Benth) seeds "; **J. Sci. Food Agric.** , 1993 ,

61 : 125-127.

FRIEDMAN, Mendel. " Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato

polyphenols. A review "; **J. Agric. Food Chem.** , 1997 , **45**(5) : 1523-1540.

---- y Felicidad F. Bautista. " Inhibition of polyphenol oxidase by

thiol in the absence and presence of potato tissue suspensions "; **J. Agric.**

Food Chem. , 1995 , **43**(1) : 69-76.

FUJITA, Shuji ... et al. " Purification and properties of polyphenol oxidase from

cabbage (*Brassica oleracea* L.) "; **J. Agric. Food Chem.** , 1995 ,

43(5) : 1138-1142.

FUJITA, Shuji ; Tetsuzo Tono y Hayato Kawahara. " Purification and properties of polyphenol oxidase in head lettuce (*Latuca sativa*) "; J. Sci. Food Agric. , 1991 , **55** : 643-651.

HASEGAWA, Shin y V. P. Maier. " Polyphenol oxidase of dates "; J. Agric. Food Chem. , 1980 , **28**(5) : 891-893.

JANOVITZ-KLAPP, Arturo H. ; Florence C. Richard ; Pascale M. Goupy y Jaques J. Nicolas. " Kinetic studies on apple polyphenol oxidase "; Journal of Agricultural and Food Chemistry , 1990 , **38**(7) : 1437-1441.

KADER, Farid ; Bernard Rovel ; Michel Girardin y Maurice Metche.

" Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). Partial purification and characterization of Blueberry polyphenol oxidase "; J. Sci. Food Agric. , 1997 , **73** : 513-516.

KERMASHA, Selim ; Mireille Goetghebeur y Alan Monfette. " Studies on inhibition of mushroom polyphenol oxidase using chlorogenic acid as substrate "; J. Agric. Food Chem. , 1993 , **41**(4) : 526-531.

LACKI, K. y Z. Duvnjak. " Modeling the enzymatic transformation of 3,5-dimethoxy,4-hydroxy cinnamic acid by polyphenol oxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor* "; Biotechnology and Bioengineering , 1996 , **51**(3) : 249-259.

LOURENCO, Euclides J. Valdir A. Neves y Maraíza A. Da Silva. " Polyphenol oxidase from sweet potato : purification and properties "; J. Agric. Food Chem. , 1992 , **40**(12) : 2369-2373.

OSZMIANSKI, Jan y Chang Y. Lee. " Inhibition of polyphenol oxidase activity

- and brownig by honey "; J. Agric. Food Chem. , 1990 ,
38(10) : 1892-1895.
- PARK, E. Y. y B. S. Luh. " Polyphenol oxidase of kiwi fruit "; Journal of Food Science , 1985 , 50 : 678-684.
- PATIL, S. S. y M. Zucker. "Potato phenolases : purification and properties"; J. Biol. Chem. , 1965, 240 : 3938-3943.
- PIFFAUT, Bernadette y Maurice Metche. " Properties of peroxidase and polyphenol oxidase in natural complexes from walnuts (*Juglans regia*) and in active DL-DOPA copolymers "; J. Sci. Food Agric. , 1991 , 57 : 493-506.
- RICHARD, Florence C. ... et al. " Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase "; J. Agric. Food Chem. , 1991 , 39(5) : 841-847.
- RICQUEBOURG, Stéphanie L. ... et al. " Theoretical support for a conformational change of polyphenol oxidase induced by metabisulfite "; J. Agric. Food Chem. , 1996 , 44(11) : 3457-3460.
- ROBERT, Christine M. ... et al. " Kinetic study of the irreversible thermal deactivation of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase an effect of pH "; J. Agric. Food Chem. , 1995 , 43(5) : 1143-1150.
- ROLLE, R. S. ; N. Guizani , J. S. Chen , M. R. Marshall , J. S. Young y C. I. Wei. "Purification and characterization of phenoloxidase isoforms from taiwanese tiger shrimp (*Penaeus monodon*)"; J. Food Biochem. , 1991 , 15 : 17-32.
- SAKIROGLU, Halis ... et al. " Purification and characterization of dog-rose

- (*Rosa dumalis* Rechst.) polyphenol oxidase "; **J. Agric. Food Chem.** , 1996 , **44**(10) : 2982-2986.
- SARUNO**, R. ; F. Kato y T. Ikeno. "Kojic acid, a tyrosinase inhibitor from *Aspergillus albus* "; **Agric. Biol. Chem.** , 1979 , **43** : 1337-1339.
- SHARMA**, Rakesh C. y Rashid Ali. " Isolation and characterization of catechol oxidase from *Solanum melongena* "; **Phytochemistry** , 1980 , **19** : 1597-1600.
- SIM**, Sopheak K. ; Sarah M. Ohmann y Cindy B. S. Tang. "Comparison of polyphenol oxidase in tubers of *Solanum tuberosum* and the non-browning tubers of *Solanum hjertingii* "; **American Potato Journal** , 1997 , **74** : 1-13.
- SIMPSON**, Benjamin K. ; Maurice R. Marshall y W. Steven Otwell. " Phenol oxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*) : purification and some properties "; **J. Agric. Food Chem.** , 1987 , **35**(6) : 918-921.
- VALERO**, Edelmira ; Ramón Varón y Francisco García-Carmona. " Kinetic study of the effect of metabisulfite on polyphenol oxidase "; **J. Agric. Food Chem.** , 1992 , **40**(5) : 904-908.
- VALERO**, Edelmira ; Manuela García-Moreno ; Ramón Varón y Francisco García-Carmona. " Time-dependent inhibition of grape polyphenol oxidase by tropolone "; **J. Agric Food Chem.** , 1991 , **39**(6) : 1043-1046.
- ZHOU**, Hong-wei y Xen Feng. " Polyphenol oxidase from Yali pear (*Pyrus bretschneider*) "; **J. Sci. Food Agric.** , 1991 , **57** : 307-313.
- ZHOU**, Peigen ; Nancy L. Smith y Chang Y. Lee. " Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase "; **J. Agric. Food Chem.** , 1993 , **41**(4) : 532-536.

Anexos.



ANEXO A.1**METODOLOGIA DE CALCULO PARA EL TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS PARA LA ENZIMA UREASA.**

PARA CONOCER LA CANTIDAD DE UREA QUE LA ENZIMA UREASA DEGRADA, SE EVALUA LA CANTIDAD DE AMONIO PRESENTE A PARTIR DE SU NEUTRALIZACION CON ACIDO CLORHIDRICO.

ESTO SE LLEVA A CABO DESPUES DE OBTENER LOS GASTOS DEL ACIDO PARA LA TITULACION DE LOS TUBOS DE ENSAYE EN LOS QUE SE LLEVO A CABO EL ESTUDIO DE LA REACCION.

A PARTIR DE ESTOS RESULTADOS SE EFECTUA EL SIGUIENTE PROCEDIMIENTO PARA CADA UNO DE LOS EXPERIMENTOS PROPUESTOS.

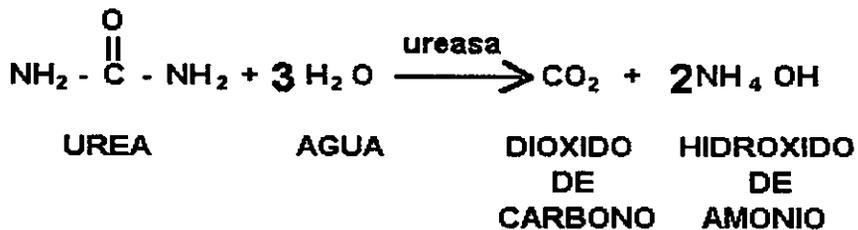
1. RESTAR EL GASTO DE ACIDO CLORHIDRICO 0.01 N DEL TUBO PROBLEMA 1 (TP-1) AL GASTO DEL TUBO BLANCO 1 (TB-1).

$$\mathbf{VTP\ 1 - VTB\ 2 = VTC}$$

DONDE:

VTC = VALOR DE TITULACION CORREGIDO QUE REPRESENTA LA CANTIDAD DE HCL REQUERIDO PARA NEUTRALIZAR EL AMONIO PRESENTE.

2. CONSIDERANDO LA CONCENTRACION DEL ACIDO CLORHIDRICO QUE ES DE 0.01 N Y QUE LA REACCION QUE HIDROLIZA LA UREASA ES:



3. EFECTUE LA CORRECCION DEL VALOR DE TITULACION CORREGIDO

VTC, MULTIPLICANDO CADA VALOR POR EL FACTOR DE CORRECCION ESTEQUIOMETRICO DE **5**, PARA OBTENER LOS MICRO MOLES DE UREA HIDROLIZADOS POR LA UREASA, ESTO ES:

$$\text{VTC} \times 5 = \mu\text{moles de urea hidrolizados.}$$

4. EFECTUE LOS PASOS 1 A 3 CON TODOS LOS VALORES DE TUBOS
BLANCOS Y PROBLEMA.

5. PROCEDA A REALIZAR LAS GRAFICAS QUE SE LE SOLICITEN,
DEPENDIENDO DE CADA PARAMETRO ESTUDIADO.

6. SOLICITE A SU ASESOR LE ACLARE CUALQUIER DUDA RELACIONADO
AL TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS.

ANEXO A.2

MANUAL DE OPERACIÓN DEL FOTOCOLORÍMETRO KLETT SUMMERSON ⁵⁴

A.2.1 Introducción

El Fotocolorímetro Klett Summerson es un aparato muy sensible que permite obtener lecturas de longitud de onda de soluciones coloreadas.

Tiene varios filtros que se colocan en el aparato y cada uno maneja diferente longitud de onda.

Tabla A. 2 Características de los filtros del fotocolorímetro.

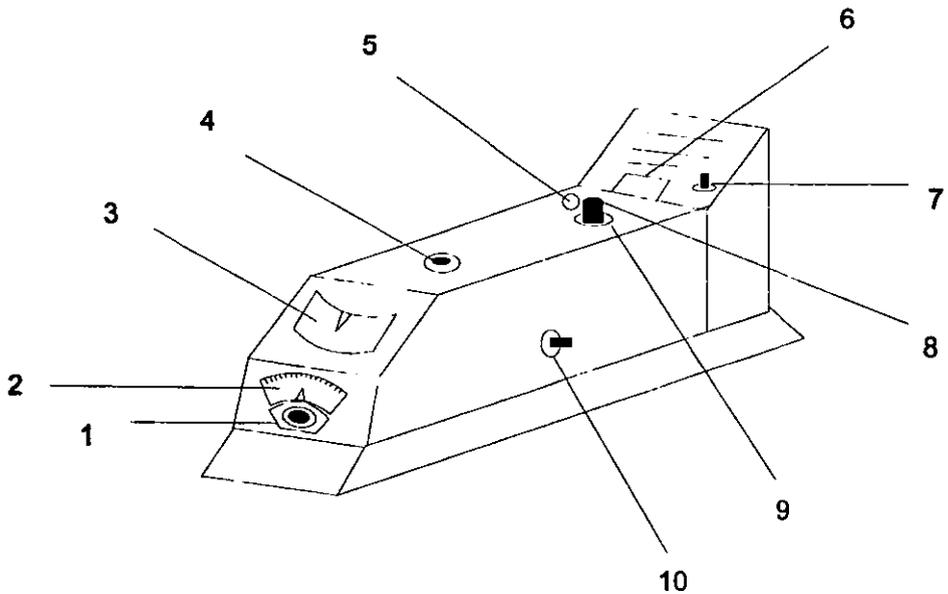
Número de filtro	color del filtro	aproximación espectral	color de solución a leer
42	azul.	400-465	rojo, anaranjado, amarillo, verde.
54	verde.	500-570	rojo, amarillo, anaranjado, azul.
66	rojo	640-700	azul, verde

⁵⁴ Basado en la técnica de manejo descrita por Grisel Campos Caltenco, *et. al.*, Manual de bioquímica celular, apéndice 7. pp.86-88.

A.2.2. Componentes del fotocolorímetro klett summerson.

El fotocolorímetro Klett Summerson es un equipo que consta de los siguientes elementos, los cuales son descritos en la fig. A.2

Fig. A.2 FOTOCOLORIMETRO KLETT SUMMERSON.



- 1.- Botón de ajuste potenciométrico
- 2.- Lectura de escala potenciométrica
- 3.- Manecilla galvanométrica
- 4.- Manecilla de ajuste galvanométrica

- 5.- Botón de ajuste a cero.
- 6.- Cabezal para filtro colorimétrico
- 7.- Botón de encendido/apagado de la lámpara de luz.
- 8.- Tubo colorimétrico
- 9.- Base del tubo colorimétrico
- 10.- Botón de encendido/apagado del fotocolorímetro Klett

A.2.3 Instrucciones de manejo del fotocolorímetro klett summerson.

1. Colocar el fotocolorímetro klett en una superficie plana libre de vibraciones, solventes corrosivos y humedad excesiva.
2. Verificar que exista cerca una toma de energía eléctrica libre de cualquier obstáculo o equipo de laboratorio que pueda representar un factor de riesgo o accidente durante la toma de lecturas.
3. Verificar que el botón de encendido/apagado (10) del equipo, se encuentre en posición de apagado "off".
4. Verificar que el botón de encendido apagado de la lámpara de luz (7) se encuentre en posición "off"
5. Conectar el fotocolorímetro klett a la toma de energía

eléctrica que maneje una corriente de 110-120 volts.

6. Colocar el filtro verde en el cabezal para el filtro colorimétrico (6)

7. Verificar que la manecilla galvanométrica (3) este alineada con la manecilla de la escala potenciométrica (2). si no coinciden, girar el botón de ajuste de la manecilla galvanométrica (4) hasta que estén alineadas (3) y (2) con el equipo apagado.

nota: el paso 7 solo se efectúa al inicio, antes de que el equipo sea encendido y utilizado.

8. Colocar en posición de encendido "on" el botón de encendido/apagado del fotocolorimetro (10).

9. Proceder de igual forma con el botón de encendido/apagado de la lampara de luz (7) y esperar 10 minutos a que esta alcance su máxima emisión de luz.

10. En un área plana y despejada, enjuague el tubo para muestra del fotocolorimetro (8) con agua destilada procurando manejarlo con extremo cuidado y sin tocarlo por la parte que entra al fotocolorimetro.

11. Vaciar en el tubo para muestras (8) una pequeña cantidad del tubo b-1 hasta que el tubo esté lleno hasta la marca indicada.

12. Introducir el tubo (8) con la muestra en la base del tubo (9)

13. Girar el botón de ajuste potenciométrico (1) hasta que la escala potenciométrica (2) esté en cero.

nota: si la manecilla galvanométrica (3) se mueve; ajuste ésta con el botón de ajuste a cero (5), hasta que coincida con la escala potenciométrica (2).

14. Ya calibrado el equipo con la muestra, retire el tubo (8) y deseche el contenido.

15. Vierta la solución p-1 en el tubo (8) como se describe en el paso 11.

16. Introduzca el tubo (8) en la base (9).

17. Gire el botón de ajuste potenciométrico (1) hasta que la manecilla de la escala potenciométrica (2) coincida con la manecilla galvanométrica (3).

18. Anote la lectura que registra la escala (2).

19. Retire de la base (9) el tubo con la muestra p-1 (8)

 20. Proceda de la misma forma con todos los tubos b- y p- como se describe en los pasos 11 al 19.

 21. Al terminar de registrar las lecturas de todas las muestras, limpie el tubo (8) como se describe en el paso 10 y déjelo secar, **no lo seque con ningún material porque puede romperlo.**

 22. Coloque en posición de apagado "off" el botón (7)

 23. Coloque en posición "off" el botón (10).

 24. Retire con el equipo **apagado** el filtro colorimétrico del cabezal (6) y colóquelo en un lugar **seguro**.

 25. Desconecte el fotocolorímetro de la toma de energía.
- nota :** las lecturas obtenidas a partir del fotocolorímetro klett summerson, deben dividirse por el factor de 500, para obtener valores de densidad óptica.

ANEXO A.3

MANUAL DE OPERACION DEL ESPECTROFOTOMETRO SPECTRONIC 21.⁵⁵,⁵⁶

A.3.1 Introducción

Un espectrofotómetro es un aparato de alta sensibilidad, que se utiliza para medir soluciones de gran absorbancia. Su fundamento se basa en que la luz o energía radiante que atraviesa un medio transparente puede ser absorbida, transmitida o reflejada.

Están graduados con diversas longitudes de onda para obtener lecturas de absorbancia y transmitancia. La longitud de onda (λ) se puede expresar en :

nanómetros (nm) = milimicra (mm) = $10 \cdot 10^{-6}$ mm.

Angstrom (A) = $10 \cdot 10^{-7}$ mm = mm / 10

Entre los rangos de medidas de longitud de onda que manejan, están :

ULTRAVIOLETA	de 185 - 400 nm,
VISIBLE	de 400 - 760 nm
INFRARROJO	de 0.76 - 15 mm,

⁵⁵ Basado en D. Pearson, Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos, apéndice II, p. 305- 308.

⁵⁶ Basado en Grisel Campos Caltenco et al., Manual de bioquímica celular, apéndice VIII, p. 89 - 91.

dependiendo de la longitud de onda deseada, es el tipo de espectrofotómetro requerido.

Los espectrofotómetros pueden ser de aguja o digitales y pueden poseer una lámpara de tungsteno para longitud de onda visible o una lámpara de deuterio para longitud de onda ultravioleta o bien ambas dependiendo del modelo del equipo. El Spectronic 21 cuenta con lámpara de tungsteno y de deuterio.

Todos, sin importar el modelo ni si son de aguja o digital, se basan en el mismo principio; también se manejan igual, solamente difieren en la exactitud para reportar las lecturas de absorbancia o transmitancia.

Existen algunos factores que deben tomarse en cuenta para efectuar una adecuada medición de lecturas de la sustancia a estudiar en el espectrofotómetro, entre ellas : ⁵⁷.

- 1) Selección de la longitud de onda deseada
- 2) Efecto del reactivo (exceso)
- 3) Efecto del tiempo
- 4) Efecto del pH
- 5) Efecto de la Temperatura
- 6) Conformidad con la Ley de Beer
- 7) Efectos de las soluciones extrañas
- 8) Precisión del método.

⁵⁷ Campos et al. , Manual de Bioquímica . . . , p. 89.

A partir de la Ley de Lambert - Beer, se deriva el término de Densidad óptica (D.O.) que se refiere a la medida de extinción independiente de la concentración de sustancia y del camino de la radiación de la luz..⁵⁸

$$D.O. = A = \lg \frac{I_0}{I}$$

donde :

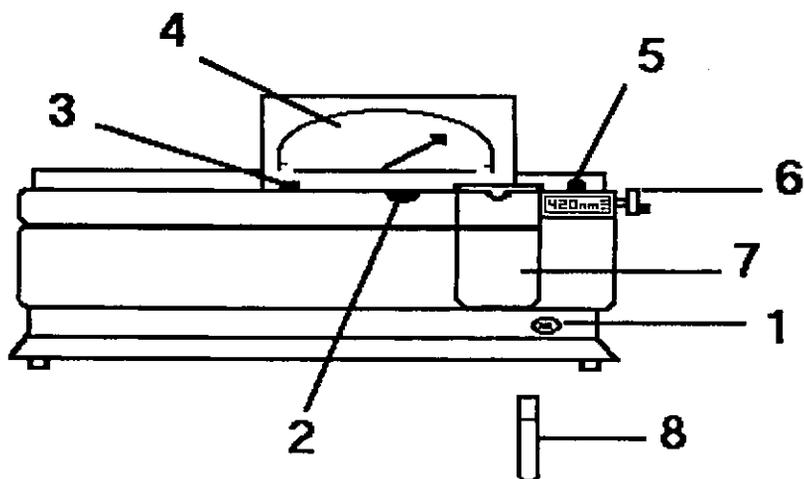
I_0 = intensidad de la luz incidente

I = intensidad de la concentración de la luz transmitida.

⁵⁸ Para mayor información sobre el tema, se sugiere revisar : Pearson, op.cit. , p. 306,307.

A.3.2. Componentes del espectrofotómetro

El espectrofotómetro Spectronic 21 con que se cuenta (Ver fig A.3) consta de los siguientes componentes :



**Fig. A.3 Espectrofotómetro de aguja
Modelo Spectronic 21.**

- 1.- Interruptor de encendido / apagado
- 2.- Botón de seguridad
- 3.- Botón de ajuste
- 4.- Escala de lectura
- 5.- Lámpara
- 6.- Selector de longitud de onda
- 7.- Compartimiento para la celda
- 8.- Celda para muestras

A.3.3. Instrucciones de operación.

- 1.- Colocar el aparato en una superficie plana, libre de vibraciones, solventes corrosivos y humedad excesiva.
- 2.- Verificar que exista cerca una toma de energía eléctrica libre de obstáculos o material de laboratorio que pueda representar un factor de riesgo o accidente durante su uso.
- 3.- Compruebe que el interruptor de encendido / apagado (1) se encuentre en la posición de apagado "OFF".
- 4.- Conecte el aparato a la toma de energía.
- 5.- Oprima el botón de seguridad (2) para permitir el paso de luz.
- 6.- Elija la longitud de onda deseada por medio del selector (6)
- 7.- Dependiendo de la longitud de onda elegida, seleccione el tipo de lámpara requerida :
de deuterio para longitud de onda U.V. (rango de 185-400 nm) .
de tungsteno para longitud de onda VISIBLE (rango de 400-760 nm) .
- 8.- Coloque el interruptor (1) en posición "ON" .
- 9.- Espere 10 minutos a que el aparato alcance su máxima capacidad de emisión de luz.
- 10.- En un área plana y despejada, enjuague la celda para muestras (8) con agua destilada, procurando manejarla con extremo cuidado sobre las paredes opacas y sin tocarla por la parte que entra al aparato.
- 11.- Vaciar en la celda para muestras (8), una pequeña cantidad de la solución del tubo B-1 hasta la 1era. marca de la celda.
- 12.- Introduzca la celda (8) en el compartimiento (7) destinado para la misma,

colocándola con las paredes translúcidas orientadas hacia el haz de luz.

- 13.- Cierre la tapa del compartimiento (7).
- 14.- Oprima el botón de seguridad (2).
- 15.- Calibre la escala (4) del aparato con el botón de ajuste (3) a cero de absorbancia y 100 de transmitancia; si éste espectrofotómetro es de aguja. Si es un espectrofotómetro digital, mover el botón de sensibilidad a cero.
- 16.- Oprima el botón de seguridad (2).
- 17.- Retire la celda (8) del compartimiento (7) y deseche el contenido.
- 18.- Vierta en la celda (8) la muestra del tubo P-1 hasta la marca indicada.
- 19.- Introduzca la celda (8) en el compartimiento (7) y cierre la tapa.
- 20.- Oprima el botón de seguridad (2)
- 21.- Registre la lectura que aparece en la escala (4).
- 22.- Oprima el botón de seguridad (2).
- 23.- Retire la celda (8) del compartimiento (7) y deseche el contenido.
- 24.- Repita el procedimiento desde el punto 11 al 23 con todos los tubos P- y B-.
- 25.- Cuando haya concluido, enjuague la celda (8) con agua destilada y colóquela en un lugar SEGURO para que se seque. NO LA LIMPIE CON NINGUN TRAPO o CUALQUIER OTRO MATERIAL, PUEDE ROMPERSE.
- 26.- Coloque el interruptor (1) en posición "OFF" (apagado).
- 27.- Desconecte el espectrofotómetro de la toma de energía.

NOTA: Las lecturas registradas son valores directos de DENSIDAD OPTICA.

Anexo A.4.
LISTADO DE REACTIVOS EMPLEADOS PARA LAS
PRACTICAS DEMOSTRATIVAS CON LA ENZIMA UREASA
(POR EQUIPO)

hoja 1 de 1

PRACTICA DEMOSTRATIVA	REACTIVO		
	CANTIDAD	UNIDAD	DESCRIPCIÓN
EXTRACCION	0.4	gr.	FRIJOL DE SOYA
	40	ml.	ETANOL AL 30% (VOL-VOL)
CUANTIFICACION	9	ml.	SOLUCION STANDARD DE ALBUMINA , 5 mg/ml
	59	ml.	SOLUCION DE NACL AL 0.9%
	47	ml.	REACTIVO DE BIURET
	0.1	ml.	EXTRACTO CRUDO DE UREASA
	1	ml.	EXTRACTO CRUDO DE UREASA DILUIDO
PURIFICACION	1	ml.	EXTRACTO CRUDO DE FRIJOL DE SOYA
	1	ml.	SUERO DE RATA
	1	ml.	UREASA Q.P..
	50	ml.	BUFFER DE BORATOS 0.005 M, p H = 8.6
	50	ml.	ÁCIDO ACÉTICO
	15	ml.	ROJO DE PONCEAU
CINETICA ENZIMATICA	28	ml.	EXTRACTO CRUDO DE UREASA
	222	ml.	UREA 0.25 M
	248	ml.	BUFFER DE FOSFATOS, PH = 7.2
	11	ml.	BUFFER DE FOSFATOS, PH = 4.5
	11	ml.	BUFFER DE FOSFATOS, PH = 6.0
	11	ml.	BUFFER DE FOSFATOS, PH = 8.5
	11	ml.	BUFFER DE FOSFATOS, PH =10.0
	29	ml.	BICLORURO DE MERCURIO AL 1 %
	9	ml.	ROJO DE METILO
200	ml.	ACIDO CLORHIDRICO 0.01 N	

ANEXO B.1

LISTADO DE REACTIVOS GLOBAL EMPLEADOS PARA LAS PRACTICAS DEMOSTRATIVAS CON LA ENZIMA POLIFENOL OXIDASA. (POR EQUIPO)

HOJA 1 DE 1

PRACTICA DEMOSTRATIVA	REACTIVO		
	CANTIDAD	UNIDAD	DESCRIPCION
SELECCION	10	gr.	PAPA BLANCA
	6	ml.	SOLUCION DE GUAYACOL AL 1%
	6	ml.	AGUA OXIGENADA AL 1%
EXTRACCION	22	gr.	PAPA BLANCA
	61	ml.	ACETONA FRIA
	40	ml.	BUFFER DE FOSFATOS pH = 7.0
	0.8	gr.	POLVO CETONICO
CUANTIFICACION	1	ml.	SOLUCION DE PPO
	7	ml.	SOLUCION STANDARD DE ALBUMINA, 5 mg/ml
	40	ml.	SOLUCION DE CLORURO DE SODIO AL 0.9%
	47	ml.	REACTIVO DE BIURET
PURIFICACION	1	ml.	SUERO DE RATA
	1	ml.	SOLUCION DE PPO
	1	ml.	FENOLASA QUIMICAMENTE PURA
		ml.	BUFFER DE TRIS BARBITAL A pH = 8.8 AL 0.005 M.
		ml.	ACIDO ACETICO
	3	ml.	PONCEAU S AL 1% EN ACIDO ACETICO ALCOHOL ABSOLUTO
CINETICA ENZIMATICA	33	ml.	SOLUCION DE PPO
	44	ml.	CATECOL AL 0.1%
	219	ml.	BUFFER DE FOSFATOS CON pH = 7.0
	9	ml.	BUFFER DE FOSFATOS CON pH = 5.0
	9	ml.	BUFFER DE FOSFATOS CON pH = 6.0
	9	ml.	BUFFER DE FOSFATOS CON pH = 8.0
	9	ml.	BUFFER DE FOSFATOS CON pH = 10.0
	64	ml.	SULFITO DE SODIO AL 1%

ANEXO C.1

LISTA DE EQUIPOS DE TECNOLOGIA RECIENTE PARA EL ESTUDIO DE LA ETAPA DE EXTRACCION Y PURIFICACION DE ENZIMAS.

- 1 EQUIPO DE ELECTROFORESIS VERTICAL BIO-RAD MODELO PROTEAN
- 1 EQUIPO DE ELECTROFORESIS BIO-RAD TRANS-BLOT-CEL
- 1 EQUIPO DE MINI ELECTROFORESIS LIFE TECHNOLOGY
- 1 CAMARA DIGITAL KODAK PARA EL ESTUDIO DE GELES DE ELECTROFORESIS
REACTIVOS PARA EL DESARROLLO DE LA TECNICA DE ELECTROFORESIS
- 1 EQUIPO PARA ELUCION DE PROTEINAS A PARTIR DE GELES MODELO GE-200, ELUTER, PROGRAMABLE Y ADAPTABLE A UN SISTEMA DE ENFRIAMIENTO CONVENCIONAL QUE INCLUYE:
 - 100 RECEPTORES DE POLIETILENO
 - 1000 DISCOS DE PAPEL FILTRO
 - 100 CÁMARAS DESECHABLES PARA MUESTRAS
 - 50 TUBOS PARA CENTRÍFUGA MANUAL.
- 1 MICROCENTRIFUGA APPENDO RF, RMC-14 CON SISTEMA DE REFRIGERACION

ANEXO C.2

LISTA DE EQUIPOS DE TECNOLOGIA RECIENTE PARA EL ESTUDIO DE LA CINETICA Y DESNATURALIZACION TERMICA DE ENZIMAS.

1 ESPECTROFOTOMETRO VARIAN CARY 1, QUE INCLUYE :

1 COMPUTADORA

1 IMPRESORA A COLOR

1 BLOCK TERMOSTATO CON RANGO DE CONTROL DE
TEMPERATURA DE 0 - 100 ° C.

1 SOPORTE PARA Sonda SOFTWARE DE CINETICA
ENZIMATICA.

1 SOFTWARE DE BIOQUIMICA

1 EXTENSION O COMPARTIMIENTO PARA MUESTRAS

8 CELDAS RECTANGULARES PARA MUESTRAS

1 REGULADOR DE VOLTAJE SOLA

1 MEDIDOR DE pH (POTENCIOMETRO) MARCA HANNA PARA CONTROL
DE TEMPERATURA DE 10 - 125 ° C.

1 CONTROLADOR DE TEMPERATURA

ANEXO C.3

LISTA DE EQUIPO Y MATERIAL COMPLEMENTARIO NECESARIO PARA EL DESARROLLO DE LAS PRACTICAS DEMOSTRATIVAS

1 REFRIGERADOR MABE RM 10

5 MICROPIPETAS LAB-SYSTEMS ESTERILIZABLES

ANEXO C.4

LISTA DE EQUIPOS DE TECNOLOGIA RECIENTE PARA EL DESARROLLO
DE LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

1 TERMOCICLADOR MODELO 24000

1 KIT PCR PARA EL DESARROLLO DE LA TECNICA QUE INCLUYE :

ENZIMA TAQ. DNA-POLIMERASA
BUFFER DNTPS
Mg ++

1 MARCADOR DE PESO 100 HP-LADDER, 250 VG

REACTIVOS PARA EL DESARROLLO DE LA TECNICA.

ANEXO C.5

LISTA DE EQUIPO AUDIOVISUAL Y DE COMPUTO PARA EL APOYO EN LA ASIGNATURA.

- 1 VIDEOCAMARA VHS PANASONIC
- 1 VIDEOGRABADORA VHS SONY
- 1 RETROPROYECTOR DE ACETATOS DUKANE
- 1 TELEVISION MARCA SONY MODELO KV
- 1 CAMARA FOTOGRAFICA NIKON MODELO F - 601

- 1 COMPUTADORA ACER PENTIUM
- 1 COMPUTADORA LANIX MULTIMEDIA
- 1 IMPRESORA LASER HEWLETT PACKARD