



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio de la β -glucosidasa en condiciones de
curado de Vainilla.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:
QUINTERO LÓPEZ KARLA AURORA**



CIUDAD UNIVERSITARIA 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO AGIGNADO

PRESIDENTE	Dr. José Luz González Chávez
VOCAL	Dr. Eleazar Martínez Barajas
SECRETARIO	Dra. María Del Pilar Cañizares Macías
1ER. SUPLENTE	Dra. Vanessa Rebeca Maya Ampudia
2DO. SUPLENTE	Jorge Arturo Aburto Anell

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Laboratorio 105-106 Sótano de Posgrado, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA

Dra. María Del Pilar Cañizares Macías

SUSTENTANTE

Karla Aurora Quintero López

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Jamás terminare de pagarles todo el esfuerzo que hicieron por darme la oportunidad de estudiar una carrera universitaria, me siento muy afortunada de ser hija de unos padres tan maravillosos, nunca me faltó su amor, su comprensión y su apoyo incondicional, esas palabras de aliento cuando me sentía desesperada por una materia , por un exámen , por algún profesor .Ustedes me impulsaron día con día para no abandonar el barco, hubo momentos difíciles, sacrificaron muchas cosas por verme realizada profesionalmente, y hoy estoy aquí compartiendo con ustedes éste paso tan importante en mi vida , le doy gracias a dios por permitir que puedan estar aún conmigo para ver los frutos de esa cosecha que iniciaron hace muchos años. Los amo profundamente a los dos y así como nunca me abandonaron ante las adversidades yo como su hija jamás lo hare, siempre estaré ahí cuando me necesiten porque si no hubiera sido por ustedes dos,no lo habría logrado. Muchas gracias por todo pero sobre todo gracias por su amor porque eso fue mi motor para salir adelante, tener sueños y hacer todo lo posible por alcanzarlos. Hoy les dedico uno de mis más grandes logros.

A MIS HERMANOS

Mauri y Chivis

Definitivamente ustedes fueron un gran ejemplo para mi, si a alguien le costó trabajo llegar sin duda alguna fue a ustedes, ambos pasaron por situaciones muy difíciles, sin embargo nunca desistieron y eso fue un impulso para decir: ¡claro que se puede! , los admiro muchísimo a los dos y los amo profundamente porque han sido unos excelentes hermanos que siempre me apoyaron , siempre estuvieron ahí , hubo sacrificios de su parte para poder cumplir con mis objetivos , este logro los comparto con ustedes por ser parte importante de mi vida , siempre podrán contar con su hermana menor.

Gracias por sus consejos , por su cariño , por momentos tan hermosos que hemos vivido como la gran familia que somos.

A OSCAR EDUARDO SAINZ ESTRADA

Mi cuñadito que tanto quiero, eres una persona muy importante para mi, además de ser parte de mi familia lo eres por el amigo que encontré en ti, eres una excelente persona, con una calidad humana inigualable, la persona más divertida, mi compañero de parrandas. Te ganaste mi cariño y mi confianza a pulso por lo que he encontrado en ti como persona, ese joven de León que era un intruso para mi hoy es un gran amigo.

Te quiero mucho Sainz, gracias por tantos momentos tan divertidos y esta mención es porque cerca o lejos siempre he contado contigo y sé que siempre podre hacerlo indudablemente.

A MI FAMILIA

A Migue Rom, David Cruz, Moñoño, Nadia, Botes, Edgar, Bety, Hugo, Ema, Tio Jorge, mi familia muégano jajajaja toda la vida juntos, son como mis hermanos, los quiero mucho y los hago partícipes de la culminación de éste ciclo y a **tía chayito y tía licha** por ser como mis otras mamás dándome cariño, consejos, regaños jaja gracias por estar presente en todo momento y por ese apoyo incondicional que siempre me han brindado en buenos y malos momentos.

A FRANCISCO LÓPEZ

Un gran ejemplo para mí, representas muchas cosas en mi vida, eres mi primo, mi hermano, mi amigo y eres una de las personas que más admiro, siempre he recibido lo mejor de ti y me has brindado esa confianza para contar contigo en todo momento, te quiero mucho y te dedico este logro tan importante para mí.

A LA DRA. MARÍA DEL PILAR CAÑIZAREZ MACÍAS

Tengo muchísimas cosas que agradecerle, siempre fue muy linda conmigo, gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted, es una persona muy cálida, súper divertida, inteligente, con un conocimiento impresionante. Cuando entré a ese laboratorio supe que no tenía que buscar más y no me equivoqué, me dio su voto de confianza, pudo elegir a cualquier otro estudiante y fui la privilegiada.

Me impulso siempre a seguir y no frustrarme cuando no salían los resultados que esperábamos, sin duda alguna hicimos un gran equipo, siempre me brindo su tiempo, su paciencia, me enseñó tantas cosas que me voy con un gran sabor de boca, una excelente asesora y le tengo un cariño muy especial.

Contenido

RESUMEN	7
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	8
1.1 β -glucosidasa en la Vainilla	9
1.2 La Vainilla	9
1.3 Proceso de Curado de las Vainas	10
1.4 Función de la β -glucosidasa en las plantas	11
1.5 Morfología, anatomía, histología de las vainas de vainilla	12
1.6 Producción de Vainilla en México	14
1.7 Las enzimas	16
1.8 Los aminoácidos	17
1.9 Propiedades físicas y químicas de la β -glucosidasa	18
1.10 Modelo de Michaelis Menten	19
OBJETIVOS.....	21
CAPÍTULO 2.METODOLOGÍA.....	22
2.1 Diagrama General del Estudio de la β -glucosidasa	23
2.2 Materiales	23
2.3 Disolución de enzima	24
2.4 Selección de longitud de onda	24
2.5 Soluciones amortiguadoras (Buffer)	24
2.6 Curva Patrón de p-Nitrofenol.....	25
2.7 Cuantificación de actividad enzimática de la β -glucosidasa	25
2.8 Optimización de pH.....	26
2.9 Optimización de Temperatura	26
2.10 Optimización de tiempo.....	26
2.11 Cinéticas enzimáticas.....	26
2.12 Determinación de Parámetros cinéticos Km y V max con enzima.....	27
2.13 Diseño de Experimentos.....	27
2.14 Actividad de la enzima con disminución gradual de agua.....	27
2.15 Inhibición por producto.....	27
CAPÍTULO 3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28

3.1 Selección de longitud de onda.....	29
3.2 Curva Patrón de p-Nitrofenol.....	30
3.3 Optimización de pH.....	32
3.4 Optimización de temperatura	33
3.5 Optimización de tiempo.....	33
3.6 Diseño de Experimentos.....	34
3.7 Cinética Enzimática en condiciones óptimas de actividad de la β -glucosidasa.....	37
3.8 Cinética enzimática a pH 6.2 (pH vainas de vainilla) a diferentes temperaturas.....	38
3.9 Inhibición por producto (Vainillina, Glucosa)	41
3.10 Efecto de la vainillina sobre los parámetros cinéticos de la β -glucosidasa a pH 6,2, 40 °C.....	42
3.11 Efecto de la disminución de H ₂ O en la actividad enzimática de la β -glucosidasa.....	43
3.11.1 Cinética enzimática al 90 %H ₂ O, pH 6,2, 40 °C	45
3.12 Curvas cinéticas a diferentes pH, temperatura, inhibidores y agua	45
CONCLUSIONES	50
AGRADECIMIENTOS	51
BIBLIOGRAFÍA	52

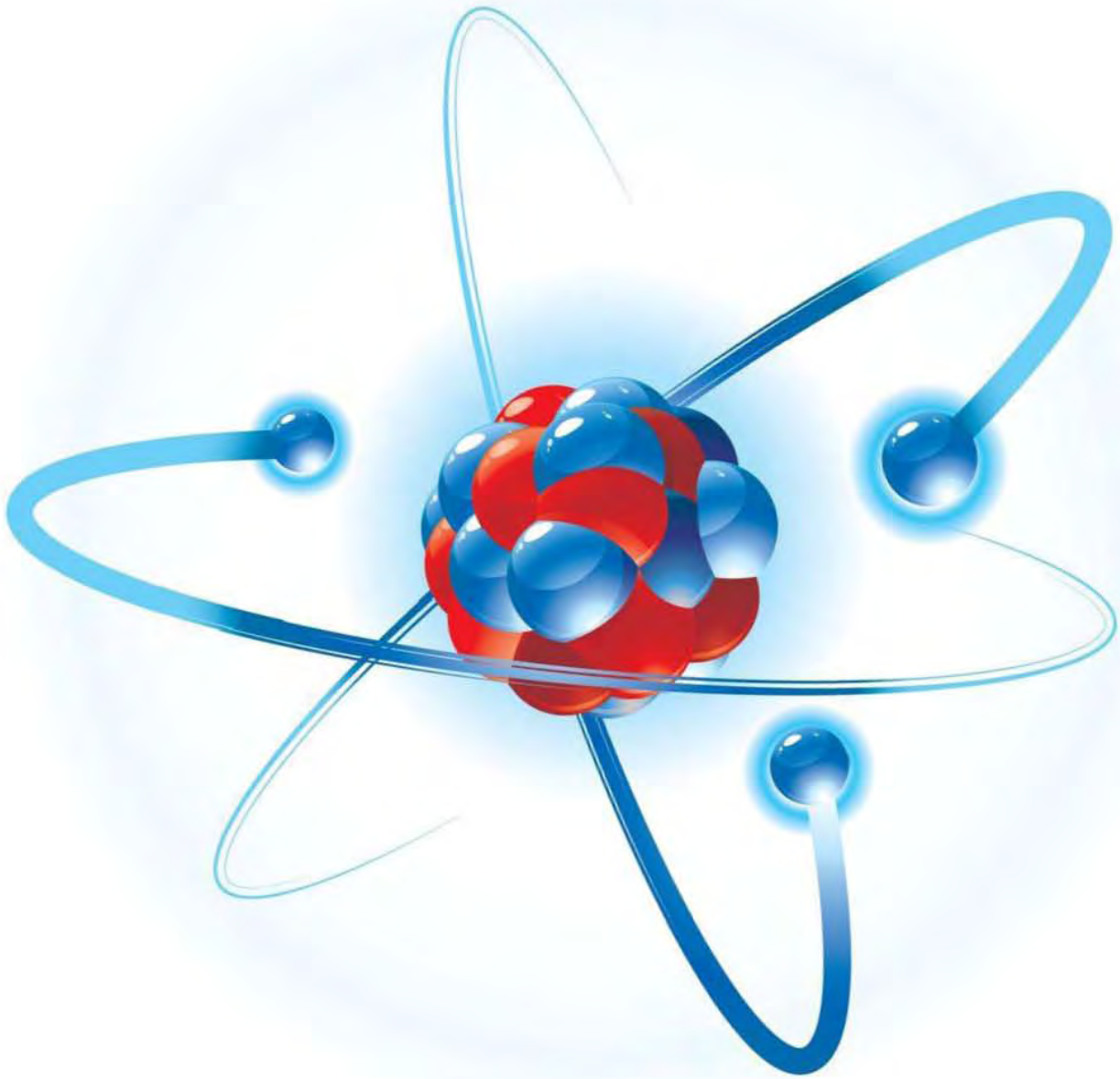
RESUMEN

El curado de la vainilla es un proceso durante el cual se generan compuestos de interés comercial como la vainillina, utilizada en la industria alimentaria principalmente como saborizante. La vainillina se genera debido a la hidrólisis de la molécula de glucovainillina por acción catalítica de la β -glucosidasa, enzima presente en las vainas.

Durante el proceso de curado las condiciones físicas y químicas de las vainas de vainilla van cambiando, tal es el caso del pH, la temperatura y la proporción de agua en el medio de reacción. Con el cambio de estas condiciones se modificara la actividad enzimática de la β -glucosidasa.

En este trabajo se evaluó la actividad de la enzima β -glucosidasa en las condiciones existentes durante el proceso de curado. Se utilizó 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido como sustrato y β -glucosidasa proveniente de almendras. Se realizaron curvas cinéticas a diferentes condiciones de pH, temperatura y proporción de agua en el medio de reacción y se evaluó la inhibición por producto de reacción por glucosa y vainillina. Se obtuvieron las condiciones óptimas de reacción para la enzima utilizada y se evaluaron los efectos debidos a los factores estudiados, con los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$. mediante el Modelo matemático de Michaelis-Menten.

Se obtuvo una aproximación del desempeño de la enzima durante el proceso de curado de las vainas de vainilla debido a que, aunque es la misma enzima β -glucosidasa, proviene de diferente matriz, por lo que pueden existir variantes en la actividad enzimática.



CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 β -glucosidasa en la Vainilla

La β -glucosidasa es una enzima que interviene en el proceso de obtención de vainillina, un compuesto de interés comercial; hidroliza el enlace β de la glucovainillina liberando glucosa y vainillina, sin embargo, la enzima no actúa en condiciones óptimas de temperatura y pH durante el proceso de curado, las vainas pierden humedad por la exposición al sol, por lo tanto la cantidad de agua en el medio es decreciente limitando la actividad enzimática y es posible que a cierta concentración de los productos de reacción (glucosa y vainillina), la enzima se inhiba.

Generalmente las reacciones químicas siguen el modelo de Arrhenius, el cual postula que la velocidad es proporcional a la temperatura debido a que aumenta la energía cinética de las moléculas y por consiguiente las colisiones entre ellas, sin embargo, una enzima sigue el modelo hasta cierto punto, ya que es una proteína y un aumento considerable de temperatura cambia su disposición tridimensional, se desnaturaliza y pierde su funcionalidad. Las enzimas poseen grupos químicos ionizables en los aminoácidos que las conforman, dependiendo del pH, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, hay un pH en donde la conformación será la más adecuada para su actividad.

En el presente trabajo se evaluaron los efectos sobre la actividad enzimática de la β -glucosidasa en condiciones de curado de vainilla y se estudiaron las condiciones óptimas para la enzima con la finalidad de obtener una aproximación acerca del desempeño de la β -glucosidasa proveniente de la vainilla durante el proceso mencionado.

1.2 La Vainilla

Hoy en día, la vainilla es considerada el saborizante de mayor importancia a nivel mundial. Su uso se distribuye en diversas y variadas industrias, que van desde la alimentaria, pasando por la licorera, refresquera, farmacéutica, cosmética, tabacalera, hasta llegar incluso, a la industria artesanal. Originaria de México y Centroamérica -Costa Rica y Honduras

De acuerdo con los datos históricos, las primeras noticias que se tienen de la vainilla datan de los años 1427-1440, período en el que los aztecas conquistaron el imperio totonaca, recibiendo como tributo vainilla.

En el estado de Veracruz las regiones productoras son: Papantla de Olarte, Martínez de la Torre, Gutiérrez Zamora, Tecolutla y Poza Rica de Hidalgo, mientras que en Puebla se ubican las zonas de Cuetzalan del Progreso, Xochitlan de Romero Rubio, Ixtepec, Caxhuacán y Huauchinango.

La planta de vainilla es una orquídea, terrestre, trepadora, de tallo flexible, cilíndrico, simple o ramificado, de color verde brillante, con una longitud de 10 a 15 cm, de 1 a 2 cm de diámetro, con hojas alternas, dispuestas en zigzag y las guías pueden llegar a medir hasta 50 metros de longitud.

La cosecha se realiza de ocho a nueve meses después de la polinización, al observar la iniciación de los cambios fisiológicos de las vainas.

La cosecha de las vainas debe iniciarse cuando se aprecie al tacto el reblandecimiento del fruto y el cambio de color verde brillante a verde amarillento opaco. Este cambio de color se inicia por el extremo inferior de la vaina o fruto y ocurre entre los 8 y los 9 meses después de la polinización (Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, Monografía de la Vainilla)

1.3 Proceso de Curado de las Vainas

El objetivo del curado es detener el proceso vegetativo natural y acelerar los cambios que llevarán a la forma de los constituyentes aromáticos del sabor (Murillo 2005).

El proceso consta de 4 fases principales:

Marchitado: Evita el desarrollo vegetativo posterior a la cosecha e inician las reacciones enzimáticas que facilitarán el desarrollo del aroma y sabor, esta fase es reconocida mediante la aparición de manchas cafés en las vainas.

Sudado: Para el desarrollo de esta fase se promueven las reacciones enzimáticas mediante el incremento de temperatura de las vainas al ser envueltas en franelas de algodón y al ser

introducidas en un cuarto diseñado para este fin que debe ser lo suficientemente ventilado para evitar la formación de mohos, se promueve un secado inicial rápido para prevenir la fermentación dañina del producto.

Secado: Se desarrolla con una exposición parcial al sol sobre patios acondicionados con materiales de la región de tal manera que se evite el contacto directo de las vainas con el suelo y se tiene como objetivo alcanzar una tercera parte del peso inicial de las vainas. Al ser expuestas al sol se envuelven nuevamente para inducir el sudado nuevamente.

Acondicionamiento: Fase posterior al secado en donde las vainas son almacenadas en rollos de aproximadamente 50 piezas envueltas en papel encerado dentro de cajas de madera con una duración aproximada de tres meses hasta alcanzar el aroma y sabor adecuado.

1.4 Función de la β -glucosidasa en las plantas

En las plantas las glucosidasas desempeñan un papel fundamental en procesos biológicos incluyendo la defensa contra patógenos y herbívoros, activación conjugada de fitohormonas y degradación de oligosacáridos de la pared celular durante la germinación (Chen et. al 2011).

Durante el beneficio se lleva a cabo la hidrólisis de la glucovainillina a vainillina (compuesto principal de la vainilla) por acción de la enzima β -glucosidasa. Durante el beneficio la enzima actúa en condiciones muy diferentes a las óptimas (pH, temperatura, cantidad de agua). En este trabajo se evaluó la actividad de la β -glucosidasa en condiciones cercanas al proceso de curado de las vainas. La figura 1 muestra la reacción que cataliza la enzima β -glucosidasa.

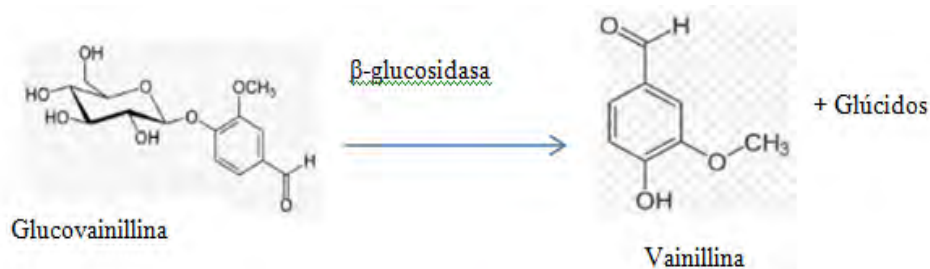


Figura1. Reacción enzimática

1.5 Morfología, anatomía, histología de las vainas de vainilla

La morfología, anatomía e histología de vainas de vainilla maduras han sido examinadas por un microscopio electrónico de transmisión. Las vainas tienen una forma triangular con una cavidad central que contiene las semillas. Cada ángulo está cubierto por células tubulares (papillae), mientras que la cavidad de los lados presenta otras células (placental laminae). El epicarpio y endocarpio están formados por una o dos capas de muy pequeñas células y las del mesocarpio son más grandes y alargadas, el citoplasma es restringido por una delgada capa de células que forman la pared (Odoux et al., 2003). En la figura 2 se muestra una vista general de la sección transversal de una Vaina verde madura de vainilla con cada una de las partes que la conforman.

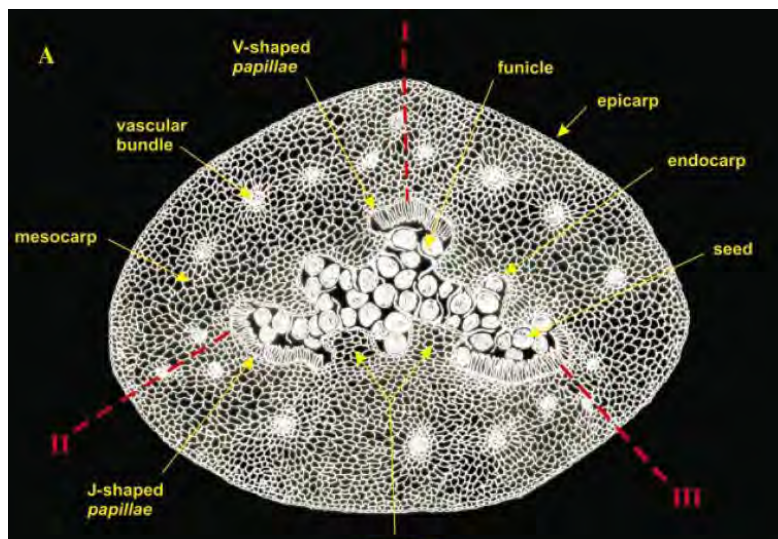


Figura 2 .Vista general de la sección transversal de Vainas verdes maduras de vainilla.

Existe una diferente localización de la enzima y el sustrato en las células de las vainas de vainilla. La β -glucosidasa está localizada en el citoplasma mientras la glucovainillina está localizada en las vacuolas, por eso la necesidad de la ruptura celular con los tratamientos térmicos y así generar la interacción enzima-sustrato (Odoux et al; 2003)



Figura 3. Micrografía de transmisión electrónica de células obtenidas de la sección placentar laminae. c, Citoplasma; m, mitocondria; er, retículo endoplásmico; v, vacuolas; cw, pared celular; ml, laminilla intermedia .

En C y D, las zonas del 1 al 7 fueron analizadas en contenido de glucovainillina y β -glucosidasa. La congelación en D condujo a la aparición de una zona blanquecina esmerilada, lechosa claramente separada de la parte externa del grano por un límite claro.

La figura 5 muestra la distribución de glucovainillina y actividad de la β -glucosidasa en las zonas 1-5 (ver figura 4), la actividad de la enzima se realizó utilizando como sustrato p-nitrofenil- β -Dglucopiranosido, se observó que en la zona 4 hay una mayor concentración de glucovainillina, por lo que la actividad enzimática de la β -glucosidasa fue mayor en dicha zona, sin embargo, la misma reacción con p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido como sustrato también manifestó una elevada y mayoritaria actividad es la zona 4, posiblemente a que al igual que la glucovainillina, la enzima presenta mayor concentración ahí (Odox et al., 2003).

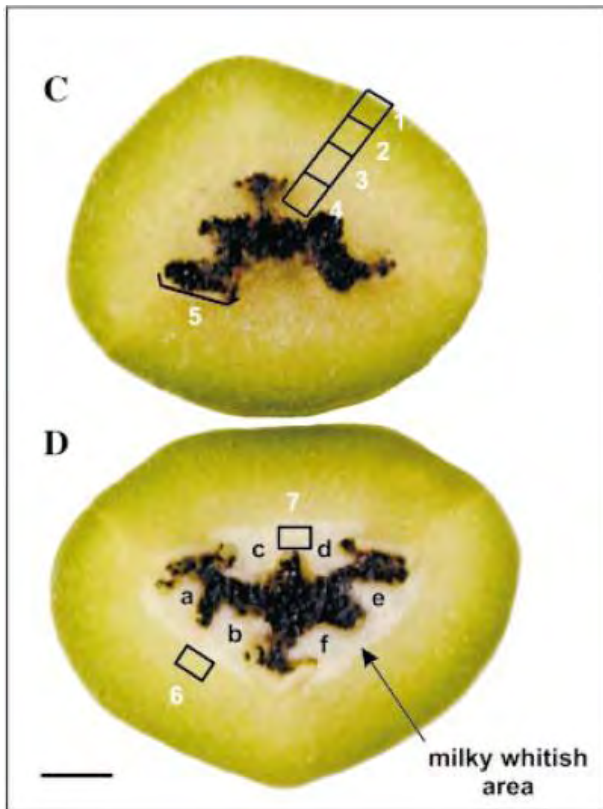


Figura 4.

C. Sección de una vaina madura verde de Vainilla

D. Sección de una vaina madura verde congelada

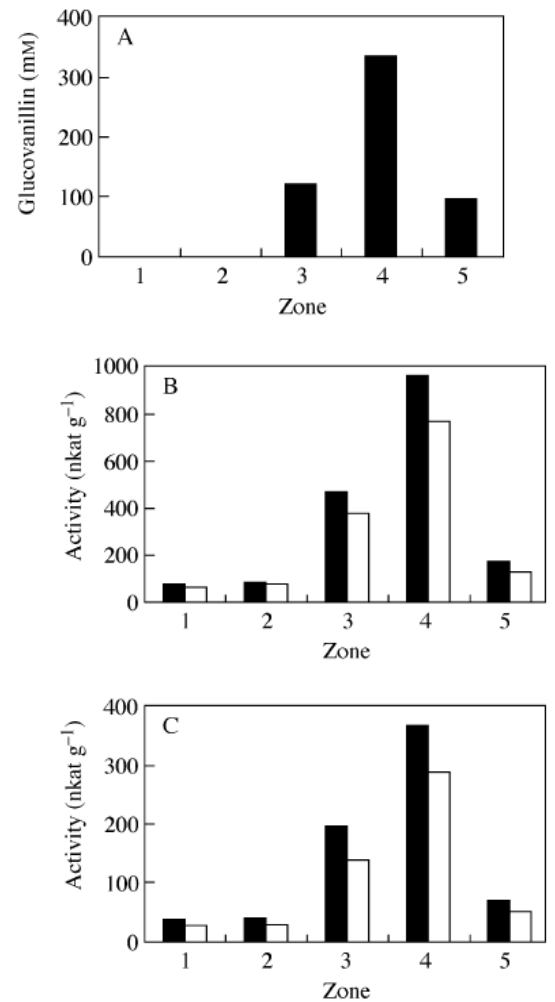


Figura 5. Distribución de glucovanillina y actividad de β -glucosidasa en zonas 1-5

1.6 Producción de Vainilla en México

La vainilla natural mexicana sigue siendo considerada como la de mejor calidad, con un olor y sabor superiores a cualquier otra. En la figura 6 se encuentran los principales países productores de vainilla.

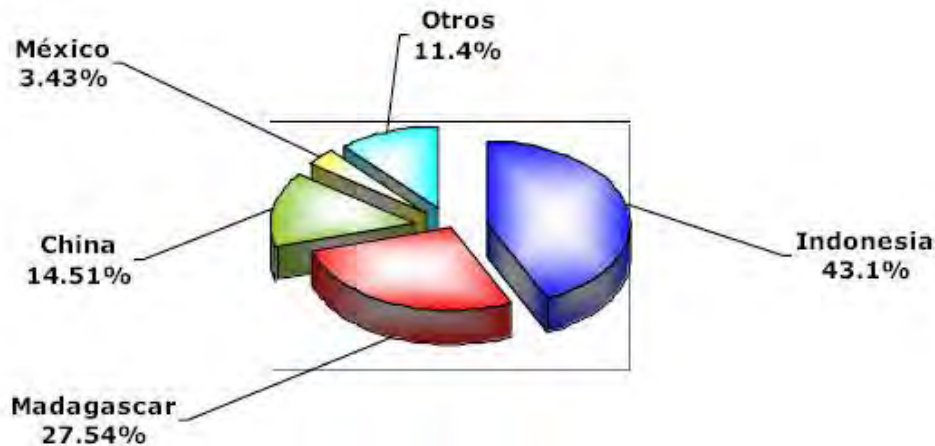


Figura 6. Países productores de vainilla

Respecto a los consumidores son cinco las naciones que requieren de la vainilla, que la utilizan como insumo en la elaboración de diversos productos, lo significativo es que son las naciones más industrializadas, como Japón, Estados Unidos, Canadá, Alemania y Francia. Recientemente Holanda también ha comenzado a solicitar grandes cantidades de vainilla. Sin embargo, hace falta la aplicación de tecnologías, el apoyo a la comercialización y contar con una visión de grandes productores, pues tan sólo la situación geográfica de México es un factor clave para ganarse el mercado del norte de América. En México, el estado de Veracruz produce más de 90 por ciento de la vainilla nacional. También se cultiva en Puebla, Oaxaca, Tabasco y San Luis Potosí, aunque en menor medida. La tabla 1 muestra los estados productores de vainilla beneficiada en México

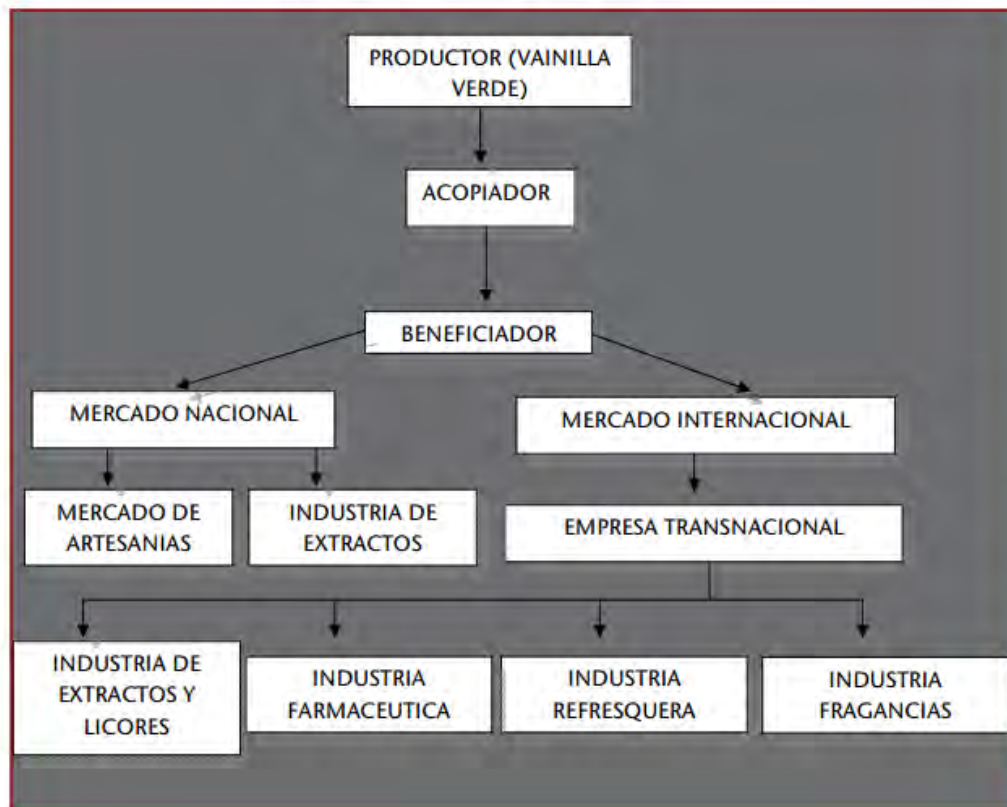
PRINCIPALES ESTADOS EN MÉXICO POR PRODUCCION DE VAINILLA BENEFICIADA
(Toneladas)

ESTADOS	2004	2005	2006	2007	2008
Veracruz	176.05	205.11	188.57	590.35	454.68
Puebla	15.6	28.9	24.25	22.44	38.2
Oaxaca	60	46	78	24.4	30
Chiapas	0.8	0.0	0.0	0.29	0.0
TOTAL	252.45	280.01	290.82	637.48	522.88

Fuente: www.siacon.sagarpa.gob.mx

Tabla 1. Estados productores de vainilla beneficiada en México

CANALES DE COMERCIALIZACION



1.7 Las enzimas

Una enzima es una proteína que se combina con uno o más compuestos de manera que reaccionan específicamente. Las enzimas al ser proteínas tienen una estructura primaria y se pliegan en una conformación particular de manera que sus grupos reactivos están dispuestos del modo apropiado para dar al conjunto actividad biológica (Arboledas, 2011).

Los grupos reactivos de una enzima tienen dos funciones: Una es unir los compuestos particulares en proximidad al sitio donde tiene lugar la catálisis. La segunda función de los grupos reactivos es realizar el mecanismo catalítico. Esto lleva consigo un cambio en la conformación del complejo enzima-sustrato que debilita los enlaces del sustrato logrando configuraciones más reactivas.

Las enzimas están compuestas, al igual que todas las proteínas, por 20 aminoácidos y se distinguen cuatro niveles de organización. Una estructura primaria que hace referencia a la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica y en la que se incluyen todos los enlaces covalentes entre los diversos residuos: los enlaces peptídicos y los puentes disulfuro.

Una estructura secundaria que se refiere, a las disposiciones regulares en el espacio de residuos adyacentes en la cadena polipeptídica, ciertas cadenas de aminoácidos favorecen las hélices α o las cadenas β , así como giros que conectan unas estructuras regulares con otras.

Un nivel de estructuración superior a éstos es la estructura terciaria, o disposición espacial de todos y cada uno de los átomos que componen la molécula. La estructura terciaria constituye el último nivel de organización estructural de una proteína monomérica. Sin embargo, existen macromoléculas oligoméricas formadas por la asociación no covalente de varias cadenas polipeptídicas. Este nivel de jerarquización superior se denomina estructura cuaternaria, por tanto, la disposición espacial de las diversas subunidades de una proteína oligomérica.

1.8 Los aminoácidos

Los aminoácidos son moléculas orgánicas que contienen un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$). Los aminoácidos proteicos son α -aminoácidos, es decir, que están formados por un carbono alfa unido a un grupo amino, otro carboxilo, a un hidrógeno y a una cadena lateral R con la que forma su cuarto enlace covalente.

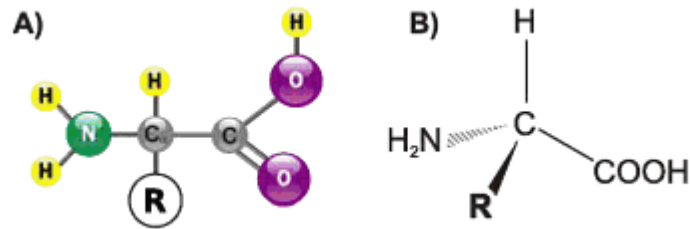


Figura 7. Estructura de un α -aminoácido (A). Los diferentes radicales R se unen al carbono α' (B). Todos los aminoácidos que aparecen en las proteínas naturales se presentan como enantiómeros L, salvo para la glicina que es aquiral.

1.9 Propiedades físicas y químicas de la β -glucosidasa

Peso molecular 135kDa

Es un homodímero que consta de 2 subunidades iguales de 65kDa cada una y es una glicoproteína.

Su solubilidad en agua es de 1 mg/mL

La enzima cataliza la siguiente reacción:



Además de los β -D-glucósidos; los β -D-galactósidos y los β -D-frucósidos, también pueden ser hidrolizados por la enzima y no requiere un activador para su acción catalítica.

La siguiente figura muestra el sitio donde actúa la enzima:

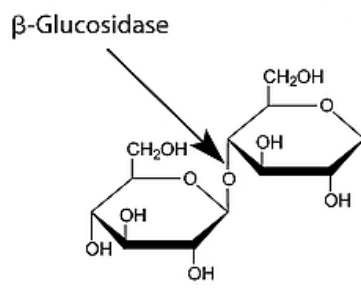
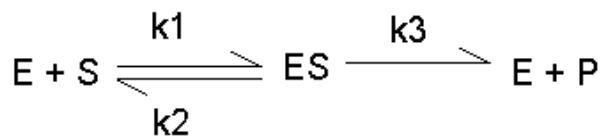


Figura 8. Enlace sobre el que actúa la enzima

1.10 Modelo de Michaelis Menten

Los estudios sistemáticos del efecto de la concentración inicial del sustrato sobre la actividad enzimática comenzaron a realizarse a finales del siglo XIX. Ya en 1882 se introdujo el concepto del complejo enzima-sustrato como intermediario del proceso de catálisis enzimática. En 1913, Leonor Michaelis y Maud Menten desarrollaron esta teoría y propusieron una ecuación de velocidad que explica el comportamiento cinético de las enzimas.

Para explicar la relación observada entre la velocidad inicial (v_0) y la concentración inicial de sustrato ($[S]_0$), Michaelis y Menten propusieron que las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren en dos etapas: En la primera etapa se forma el complejo enzima-sustrato y en la segunda, el complejo enzima-sustrato da lugar a la formación del producto, liberando la enzima.



La representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten (v_0 frente a $[S]_0$) es una hipérbola (Figura 9). La V_{max} corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental, y la K_M corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max} .

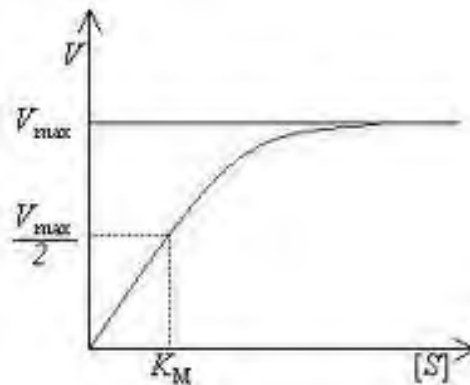


Figura 9. Gráfico representativo de una cinética enzimática

Para determinar gráficamente los valores de K_M y V_{max} es más sencillo utilizar la representación doble recíproca ($1/v_0$ frente a $1/[S]_0$), ya que es una línea recta. Esta representación doble recíproca recibe el nombre de representación de Lineweaver-Burk (Figura 10). Es una recta en la cual:

La pendiente es K_M/V_{max}

La abscisa en el origen ($1/v_0 = 0$) es $-1/K_M$

La ordenada en el origen ($1/[S]_0 = 0$) es $1/V_{max}$

De esta forma, a partir de los datos experimentales se puede calcular gráficamente, los valores de K_M y V_{max} de un enzima para diversos sustratos

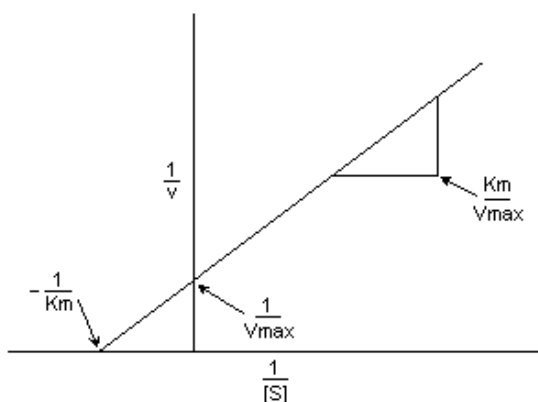


Figura 10. Gráfico Lineweaver-Burk

OBJETIVOS

Generales

Conocer el impacto de factores físicos y químicos (temperatura, pH, proporción de agua durante la reacción enzimática y posibles inhibidores) sobre la acción catalítica de la β -glucosidasa y establecer las condiciones óptimas de la enzima para comparar su actividad con respecto a las condiciones del curado de la vainilla.

Particulares

Conocer:

Las condiciones óptimas de pH y temperatura sobre la actividad enzimática de la β -glucosidasa.

La actividad enzimática con la disminución gradual de agua en el medio de reacción.

Inhibición de la enzima por productos de reacción durante el proceso de curado de las vainas de vainilla (glucosa y vainillina).

Las cinéticas enzimáticas en condiciones óptimas y en condiciones de curado de las vainas de vainilla.

Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} con el modelo matemático de Michaelis-Menten a partir de las cinéticas generadas.

The image features an abstract graphic design with three blue circles of varying sizes, each composed of concentric layers of different shades of blue. Two thin, light blue lines intersect to form a large 'V' shape that frames the circles. The text 'CAPÍTULO 2.METODOLOGÍA' is positioned in the lower-left area of the page.

CAPÍTULO 2.METODOLOGÍA

2.1 Diagrama General del Estudio de la β -glucosidasa

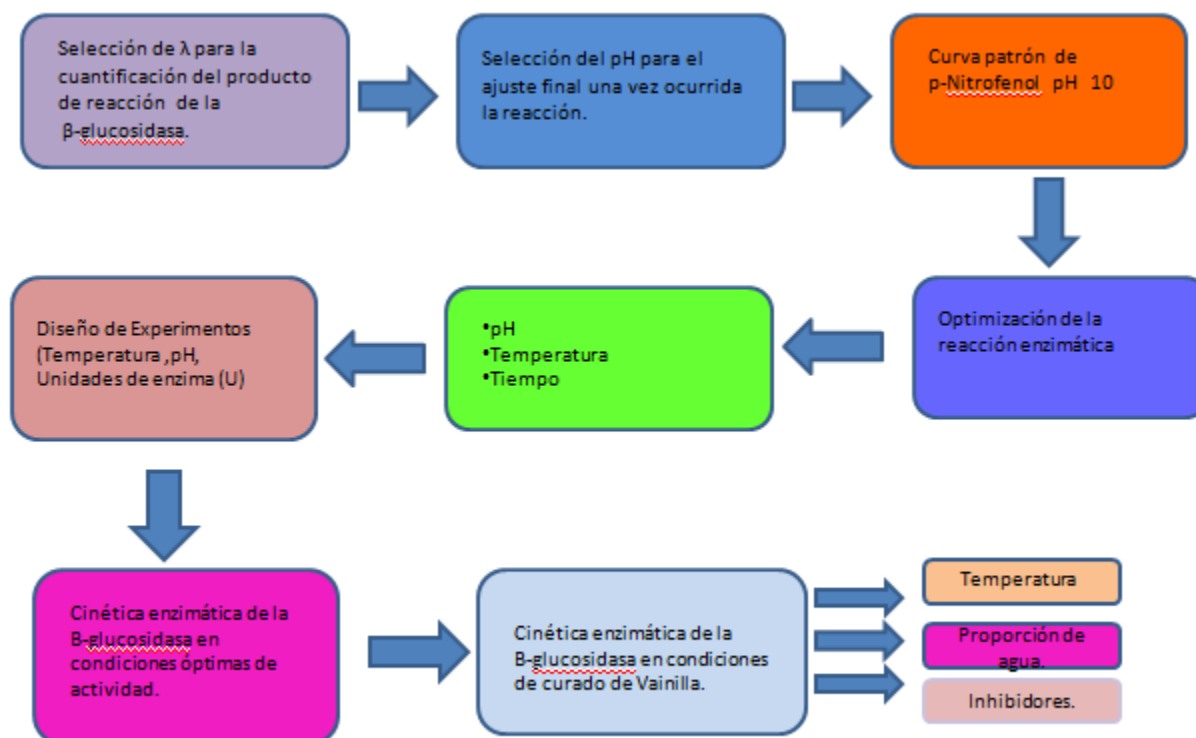


Diagrama 1. Diagrama general del estudio de la β -glucosidasa

2.2 Materiales

Se utilizó 4-Nitrofenil- β -D-glucopiranosido Sigma-Aldrich, β -glucosidasa de almendras; polvo liofilizado; 2.1U/mg sólido G0395-2.5KU Sigma Aldrich, NaOH 1N J.T Baker, KH_2PO_4 ; reactivo $\geq 99.0\%$ Sigma Aldrich, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; reactivo $\geq 98.0-102.0\%$ Sigma Aldrich, NH_4Cl J.T Baker; reactivo 99.98%, NH_4OH 28-30% J.T Baker

Espectrofotómetro Varian Cary UV-Vis, Baño de agua Lab-line, balanza analítica Ohaus modelo E12140, Potenciómetro Oakton pH 500 series modelo 00702-75.

2.3 Disolución de enzima

(U)=Unidades de enzima

Se pesaron en la balanza analítica 5mg de enzima (β -glucosidasa) y se aforó a 10ml con agua destilada.

$$\frac{5 \text{ mg enzima}}{10 \text{ ml}} * \frac{2.1 \text{ U}}{\text{mg sólido}} = 1,05 \text{ U/ml}$$

2.1 U/mg sólido son las especificaciones de la enzima utilizada

2.4 Selección de longitud de onda

Se prepararon disoluciones de reactivo (4-Nitrofenil- β -D-glucopiranosido Sigma-Aldrich) de 66.4 μ M y de p-Nitrofenol 143.8 μ M en agua destilada, disolución buffer de fosfatos pH 4.0 y pH disolución buffer de amoniaco 10.0. Se obtuvieron los espectros en UV-VIS para cada disolución determinando los picos máximos y seleccionando la longitud de onda en la cual el producto (p-nitrofenol) tuviera una mejor absorción.

2.5 Soluciones amortiguadoras (Buffer)

Se prepararon las soluciones amortiguadoras utilizando la Ecuación de Hendersson-Hasselbach:

$$pH = pka + \log \frac{\text{base}}{\text{ácido}}$$

Donde:

pH= pH al que se desea amortiguar

pka=valor del par ácido/base cercano al valor de pH que se desea amortiguar

Posteriormente se obtuvieron las concentraciones de ácido y base tomando en cuenta que la concentración del buffer requerido fue de 0.1M es decir $I_{\text{ácido}} + I_{\text{base}} = 0.1M$, una vez que se calcularon las concentraciones utilizando masa molecular, pureza y densidad en algunos casos, se calcularon los gramos o mililitros requeridos en un determinado volumen y por medio del potenciómetro se hizo la lectura y el ajuste final.

2.6 Curva Patrón de p-Nitrofenol

La curva patrón se realizó con p-nitrofenol en un rango de concentraciones de 0.35 μM hasta 1150.16 μM , a pH 10 y se realizaron lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a 400 nm, finalmente se obtuvo la línea recta con la ecuación correspondiente.

2.7 Cuantificación de actividad enzimática de la β -glucosidasa

Para el estudio se utilizó como sustrato 4-Nitrofenil- β -D-glucopiranosido Sigma Aldrich. En la figura 9 se muestra la estructura del sustrato empleado para el análisis.

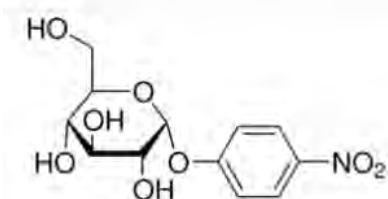


Figura 9. Estructura química del 4-Nitrofenil- β -D-glucopiranosido

Al actuar la enzima sobre el sustrato se libera p-Nitrofenol como producto de la reacción, este compuesto se cuantifica con una curva patrón, utilizando un espectrofotómetro para medir absorbancia a 400nm como lo reportó Márquez et.al. (2008)

El p-Nitrofenol es un compuesto con propiedades ácido base; se utiliza como Indicador y la zona de viraje se encuentra en la escala de pH entre 5.6 y 7.6. A pH ácido es incoloro y a pH alcalino manifiesta un color amarillo. En la siguiente figura se representa la estructura química del p-nitrofenol.

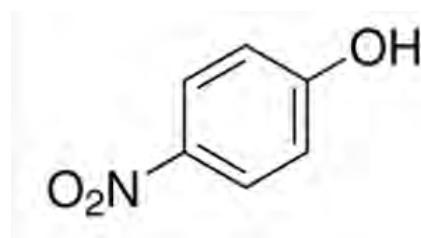


Figura 11. Estructura química del p-Nitrofenol

2.8 Optimización de pH

Para conocer el pH óptimo en el que se da la mayor actividad enzimática se preparó una disolución de (4-Nitrofenil- β -D-glucopiranosido Sigma-Aldrich) de 60.4 μ M añadiendo posteriormente 0.250 U en matraces aforados de 10ml e incubando a 42.5 °C, por 25 minutos a pH de 3, 4, 6 y 8. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se detuvo la actividad de la enzima en un baño de hielo con la finalidad de generar un choque térmico. Finalmente se tomaron 8.5 mL de cada disolución y se ajustó el pH a 10 con NaOH 0.1 N y buffer de amonio 0.1 M pH 10. Finalmente se leyeron las soluciones a 400 nm.

2.9 Optimización de Temperatura

Se llevó a cabo la reacción enzimática en matraces aforados de 10 mL a una concentración de reactivo (4-Nitrofenil- β -D-glucopiranosido Sigma-Aldrich) de 66.4 μ M, 0.250 U, pH 4, y temperaturas de 30 °C, 40 °C, 60 °C y 80 °C, al terminar la reacción se realizó un choque térmico con hielo para detenerla y finalmente se hizo un ajuste final de pH a 10 con una disolución NaOH 1 M.

2.10 Optimización de tiempo

Se llevó a cabo la reacción enzimática en matraces aforados de 10 mL con concentración de reactivo (4-Nitrofenil- β -D-glucopiranosido Sigma-Aldrich) de 66.4 μ M, 0.250 U, pH 4, 40°C a diferentes tiempos 5, 15, 25, 30, 60 minutos, posteriormente se sometieron al tratamiento de igual forma que en la sección 2.9

2.11 Cinéticas enzimáticas

Se realizaron curvas cinéticas de la enzima a pH 4.0 y al pH de las vainas de vainilla (6.2) incrementando gradualmente la concentración de sustrato (4-Nitrofenil- β -D-glucopiranosido Sigma-Aldrich) manteniendo constante la cantidad de enzima (0.150 U), 40°C y 5 min de incubación en un volumen de 8.5 mL de buffer al pH estudiado, posteriormente se sometieron al tratamiento descrito en la sección 2.10

Para la cuantificación del producto de reacción se realizó una curva patrón de p-nitrofenol a pH 10 con buffer de amonio.

2.12 Determinación de Parámetros cinéticos Km y V max con enzima

Los parámetros cinéticos de la β -glucosidasa fueron calculados de acuerdo con el modelo de Michaelis-Menten con p-Nitrofenil- β -D-glucopiranosido como sustrato y p-Nitrofenol como producto de reacción enzimática (Márquez et al. 2008).

2.13 Diseño de Experimentos

Se realizó un diseño de experimentos 2^3 con 3 puntos centrales y se estudiaron los factores de temperatura (25 °C, 42.5 °C, 60 °C), pH (4, 6, 8) y U (0.25, 0.625, 1)

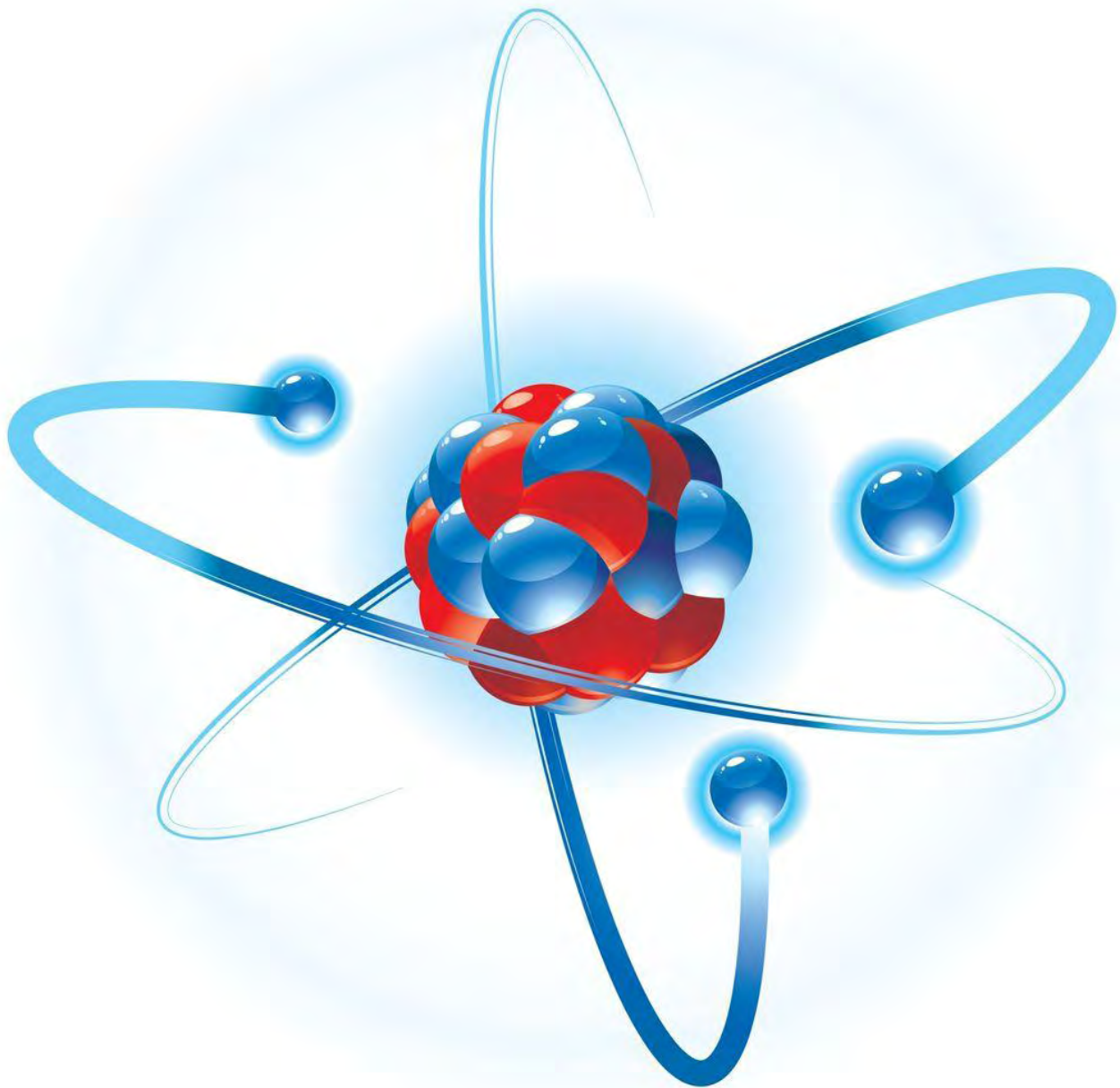
La concentración de sustrato se mantuvo constante para cada tratamiento (66.4 μ M) y al final de las reacciones se les dio un choque térmico para detener la actividad enzimática, se ajustó el pH a 10 y se midieron las absorbancias correspondientes. Se utilizó el programa Statgraphics Plus para el tratamiento de datos.

2.14 Actividad de la enzima con disminución gradual de agua

Se llevó a cabo la reacción a una concentración constante de sustrato (99 μ M), 0.150U.E, pH 6.2 con una proporción de H₂O de 10, 20, 40, 60, 75, 80, 85, 95, 100% en acetonitrilo, el tratamiento posterior a la reacción fue el mismo que se realizó en la cinética enzimática y se obtuvo la velocidad en μ M transformada/min*U a partir de la curva patrón de p-nitrofenol.

2.15 Inhibición por producto

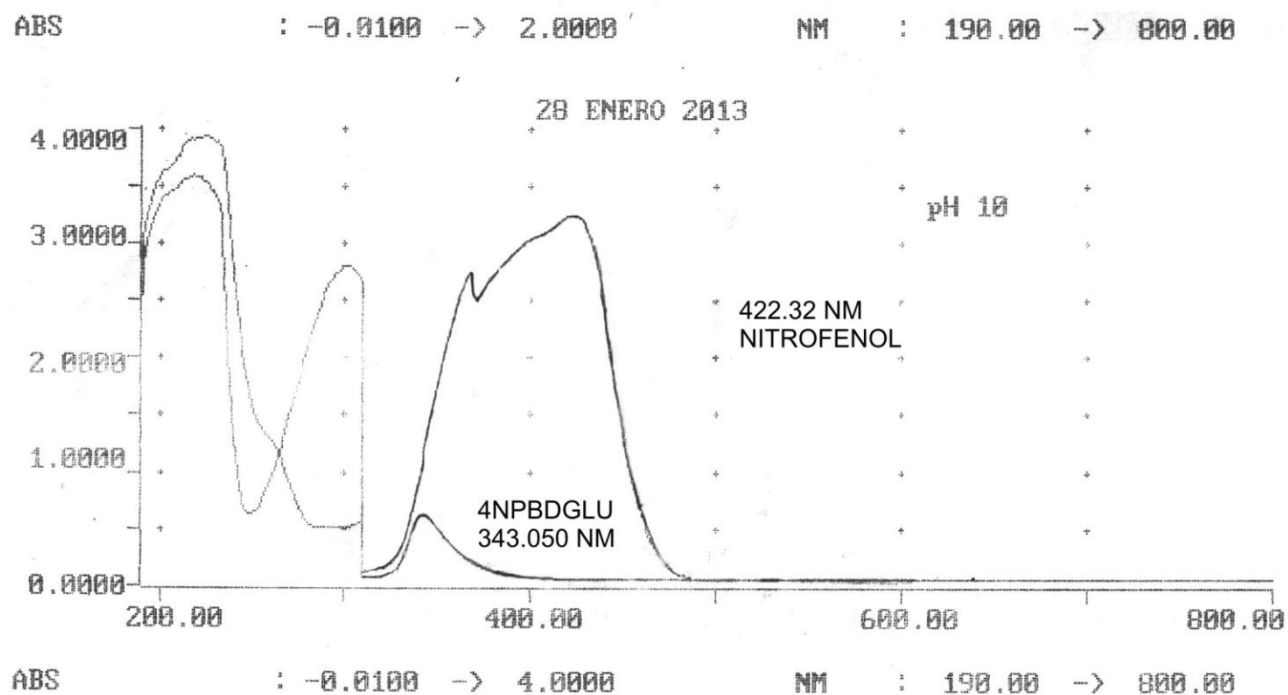
Se llevó a cabo la reacción a concentración constante de sustrato (66 μ M) incrementando gradualmente la concentración de producto (glucosa, vainillina y conjuntas) de 0.66 μ M a 664 μ M, el tratamiento posterior a la reacción fue el mismo que en la sección 2.5 y se determinó la velocidad en μ M transformada por minuto a partir de la curva patrón de p-nitrofenol.



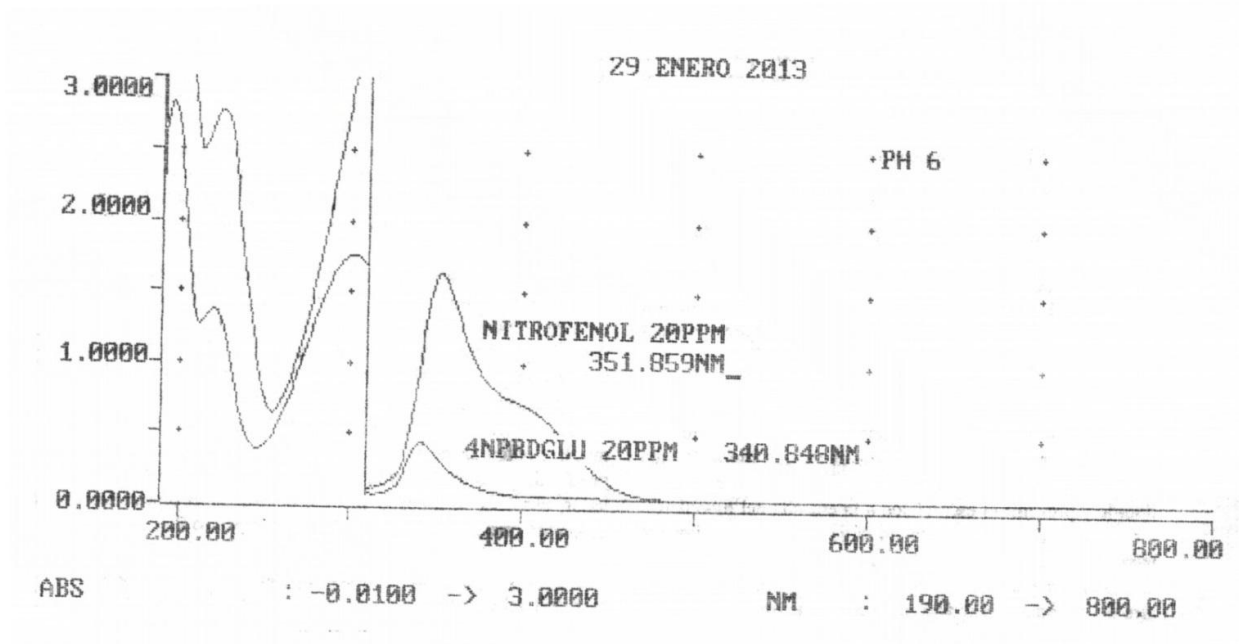
CAPÍTULO 3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Selección de longitud de onda

En las Figuras 1 y 2 se muestran los espectros de absorción del p-nitrofenol y del sustrato, Se seleccionó la $\lambda=400$ nm a pH 10, ya que es en que se observa el pico de máxima absorción del p-nitrofenol debido a que por sus propiedades ácido base manifiesta un color amarillo que se intensifica a pH alcalino, sin una interferencia del sustrato, el cual al mismo pH (10) absorbió en 343 nm; en el espectro 2 correspondiente a pH 6 muestra que la zona de absorción de reactivo y producto es similar; de esta manera fue como se decidió ajustar el pH 10 después de la reacción para contar con valores de absorbancia más confiables.



Espectro 1 .Barrido de absorción del p-Nitrofenol y 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (4NPBDGLU) a pH 10



Espe

ctro 2 .Barrido de absorción del p-Nitrofenol y 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (4NPBDGLU) a pH 6

3.2 Curva Patrón de p-Nitrofenol

En la tabla 2 se muestran las absorbancias obtenidas para determinar la concentración de p-nitrofenol.

Concentración μM Nitrofenol	Abs
0.36	0.01
0.72	0.03
2.16	0.09
3.59	0.14
7.19	0.26
21.57	0.77
35.94	1.05
71.89	1.60
143.77	2.42
287.54	2.93
575.08	2.96
862.63	2.97
1150.16	2.98

Tabla 2. Curva patrón p-Nitrofenol

Para realizar la regresión se tomaron en cuenta los puntos hasta donde la curva presentó un comportamiento lineal y se obtuvo la ecuación correspondiente a la recta para conocer los valores de pendiente y ordenada al origen, los cuales fueron requeridos para la cuantificación de p-nitrofenol generado por la β -glucosidasa en las diferentes condiciones estudiadas.

En el Gráfico 1 se representan los puntos utilizados y la regresión con la ecuación correspondiente para la curva patrón de p-nitrofenol.

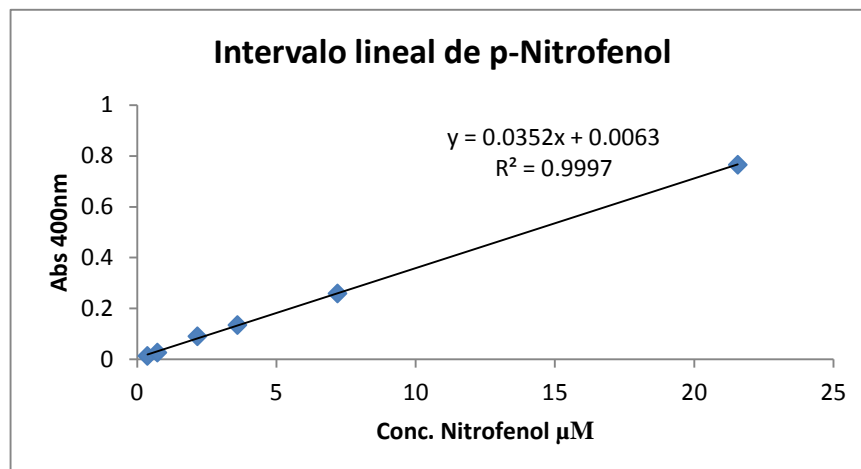


Gráfico 1. Curva patrón p-Nitrofenol

3.3 Optimización de pH

En el gráfico 2 se visualiza que la señal más alta una vez ocurrida la reacción enzimática fue a pH 4, sin embargo el pH óptimo reportado por Márquez (2008) de la β -glucosidasa proveniente de Vainilla fue de 6.5 y el pH de las vainas de Vainilla es 6.2, valor muy cercano al óptimo obtenido por Márquez.

El pH óptimo reportado para la enzima proveniente de algunos microorganismos fue reportado en un intervalo de 5 a 6.5 (Wolosowska 2004)

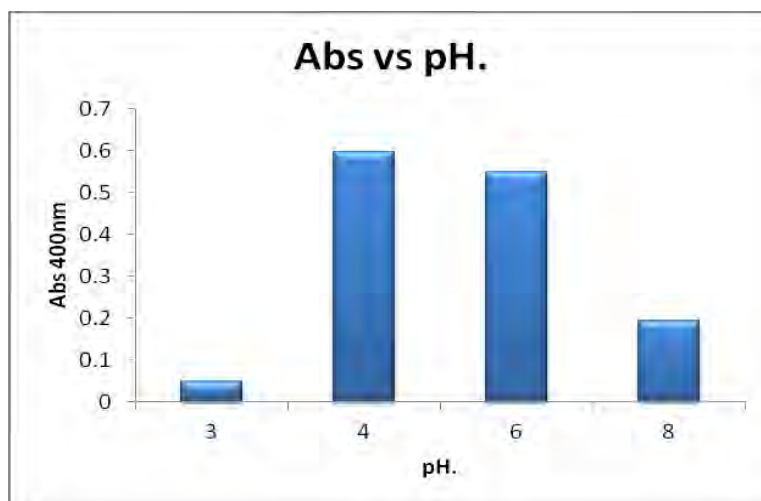


Gráfico 2. Absorbancias en diferentes valores de pH

3.4 Optimización de temperatura

Se estudiaron 3 temperaturas diferentes en grados Celsius (°C)

A 40 °C se obtuvo la mejor señal ya que en esa condición se obtuvo un valor de absorbancia mayor como se muestra en el Gráfico 3, por otro lado en la gráfica se observa también que no existe una diferencia tan grande respecto a las absorbancias entre los resultados obtenidos a 25 °C y 60 °C.

Una temperatura óptima de la β -glucosidasa de Vainilla fue de 38 °C a pH 6.5 reportada por Márquez (2008), mientras el valor para una enzima purificada proveniente de igual manera de Vainilla fue de 40 °C (Odoux et al., 2003).

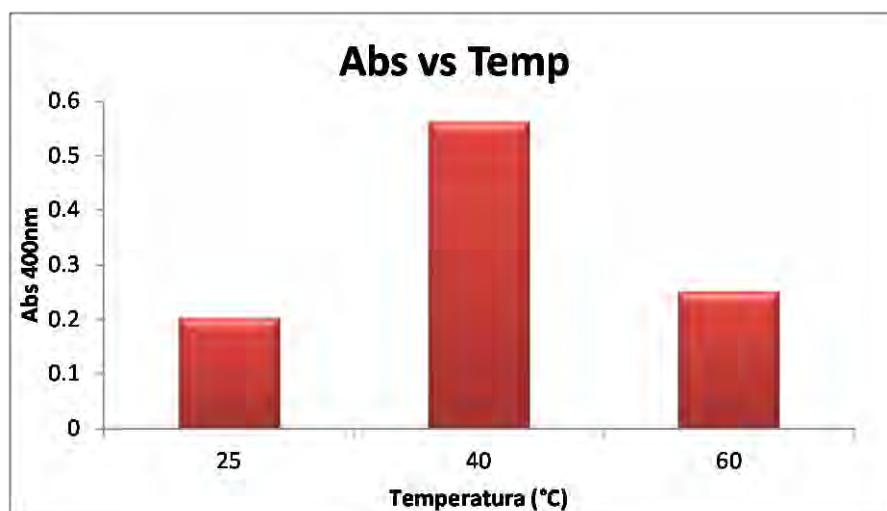


Gráfico 3. Absorbancias a diferentes temperaturas (°C)

3.5 Optimización de tiempo

En la optimización del tiempo el criterio para determinar el necesario para la reacción enzimática fue el tiempo al cual se obtuvieron señales lo suficientemente altas.

En el gráfico 4 se observan los resultados obtenidos a los diferentes tiempos estudiados, claramente se observa que la relación entre el tiempo y la absorbancia es directamente proporcional debido a que a mayor tiempo se forma mayor cantidad de producto (p-nitrofenol), sin embargo, el tiempo seleccionado fue de 5 minutos ya que a tiempos

mayores con concentraciones más altas de sustrato la señal del producto formado no permitió un estudio cinético adecuado.

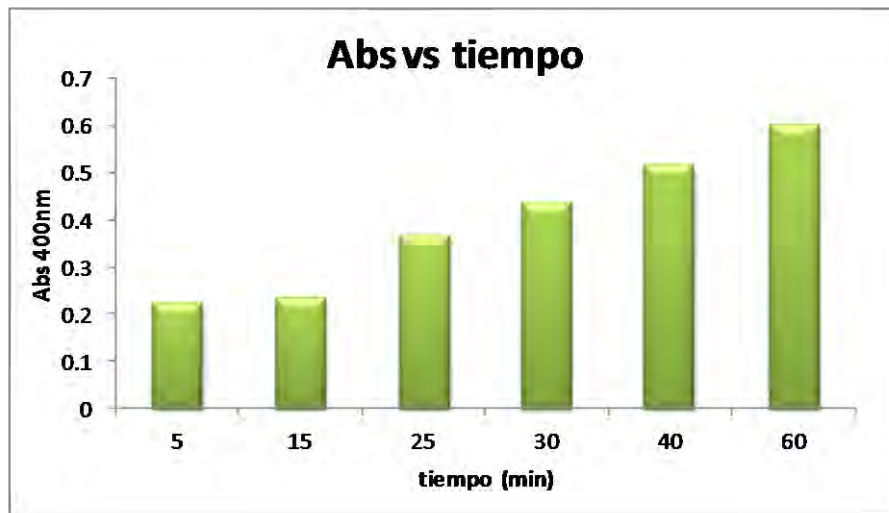


Gráfico 4. Absorbancias a tiempos diferentes de reacción

3.6 Diseño de Experimentos

El Gráfico 5 muestra el comportamiento de las señales de absorbancia a diferentes valores de los factores en estudio, se observa que la señal de absorbancia incrementó cuando la cantidad de enzima aumentó; respecto a la temperatura la absorbancia y el incremento de temperatura presentan una relación inversamente proporcional, a pH 4.0 se obtuvo la mayor señal

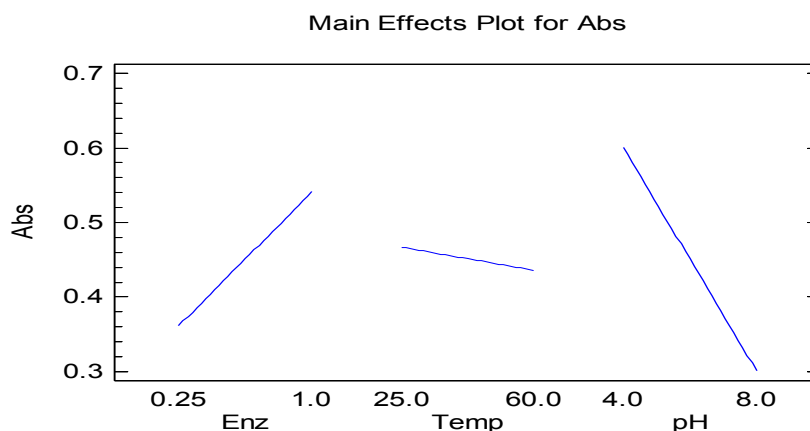


Gráfico 5. Efecto de los factores (Enzima, Temperatura, pH) sobre las señales de Absorbancia

Los efectos sobre la reacción de la β -glucosidasa de temperatura y pH son importantes para nuestro estudio para mejorar protocolos de curado y generar mayores rendimientos en la extracción de Vainillina. En el Gráfico 6 de superficies se observan los efectos por la interacción de los factores mencionados (Temperatura y pH) sobre las señales de absorbancia.

A valores de pH alto aunado a altas temperaturas las señales de absorbancia fueron bajas (baja actividad enzimática) debido a que la enzima se desnaturaliza a temperaturas elevadas por la ruptura de enlaces débiles en su estructura terciaria como puentes de hidrógeno y a valores de pH muy ácidos o muy alcalinos por la modificación de las cargas de los grupos ionizables de la enzima.

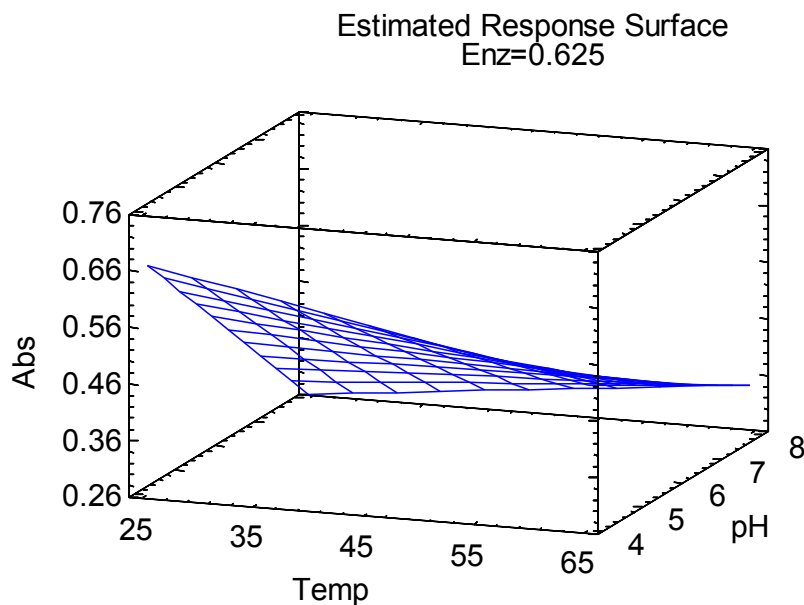


Gráfico 6. Respuesta de Absorbancia en función de la temperatura y pH

En el gráfico 7 (superficie) se visualizan la interacción entre la cantidad de enzima y el pH y el efecto sobre la señal de absorbancia.

A mayor cantidad de enzima y pH 4 se observa una mayor señal, indicativo de mayor producción de p-nitrofenol debido a que hubo mayor concentración de enzima (β -glucosidasa) reaccionando, además es el pH óptimo de actividad de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio.

La información acerca de la estabilidad térmica de la β -glucosidasa es de gran importancia para seleccionar el tratamiento térmico que se llevará a cabo durante el proceso de curado.

Un mejor conocimiento de la estabilidad enzimática en estas condiciones puede ser de gran ayuda en la optimización del proceso de curado con el propósito de incrementar los rendimientos de vainillina extraída.

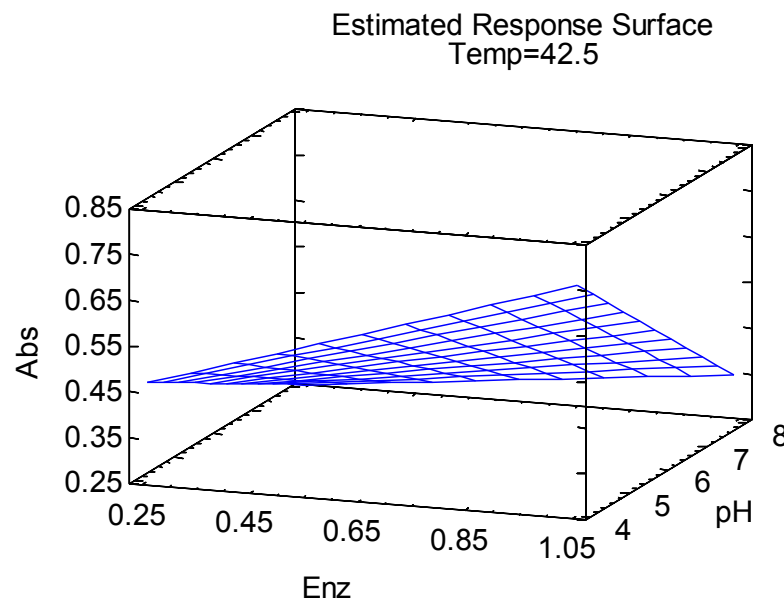


Gráfico 7. Respuesta en Absorbancia en función de la cantidad de enzima y pH.

3.7 Cinética Enzimática en condiciones óptimas de actividad de la β -glucosidasa

pH de *reacción* 4.

Tiempo de reacción: 5 minutos.

Cantidad de enzima: 0.150 U (Unidades de enzima).

Se añadieron 150 μ L de disolución de enzima preparada (1 unidad de enzima/ml)

$$(1 \text{ unidad de enzima}/1000\mu\text{L}) \cdot (150 \mu\text{L}) = (0.150 \text{ unidades de enzima})$$

Ajuste de pH *final* 10

En el gráfico 8 se observa la relación entre la velocidad y la concentración de sustrato, la parte en donde hay un cambio en la pendiente es debido a la saturación de la enzima, es decir aunque se incremente la concentración de sustrato no habrá mayor formación de producto.

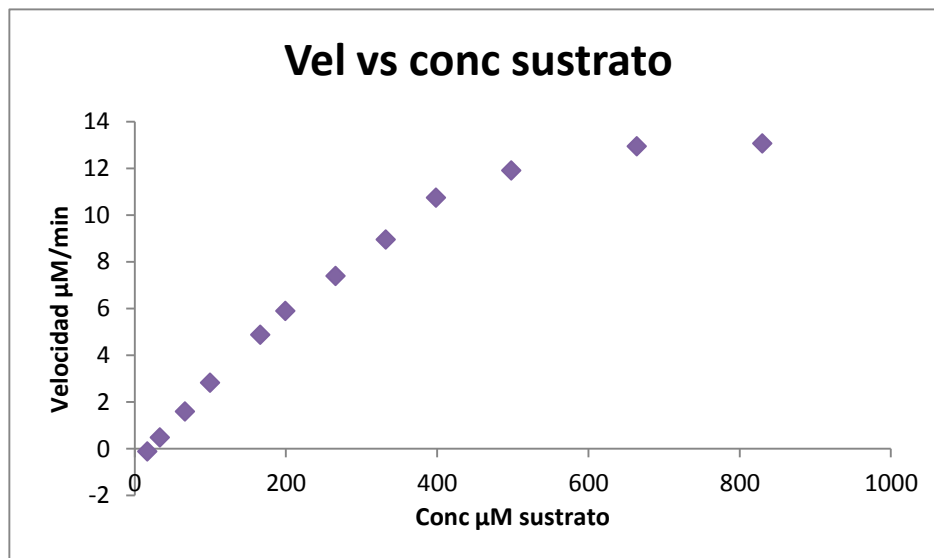


Gráfico 8. Curva cinética en condiciones óptimas pH 4, 40 °C

Con el modelo de Michaelis-Menten se linealiza la curva cinética sacando los inversos de la velocidad y la concentración de sustrato para obtener con la ecuación de la línea recta, los parámetros cinéticos K_m y V_{max} (Gráfico 9 Lineweaver Burk)

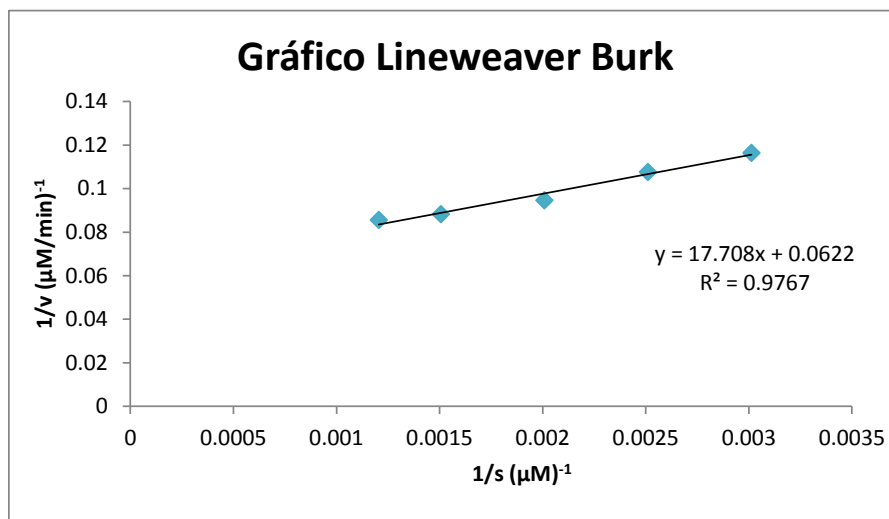


Gráfico 9. Inverso de velocidad y concentración

El inverso de la ordenada al origen representa la V_{max} y con ese valor multiplicado por la pendiente de la recta se obtuvo la constante de Michaelis (K_m) y los valores obtenidos fueron los siguientes:

V max	16.92 $\mu\text{M}/\text{min}$
Km	219.92 μM

3.8 Cinética enzimática a pH 6.2 (pH vainas de vainilla) a diferentes temperaturas

El pH de las vainas de vainilla es de 6.2 (Márquez et, al 2008), por lo que se evaluó la actividad de la enzima en las condiciones de pH de las vainas a 40 °C (temperatura óptima) como referencia para conocer las variaciones en los parámetros cinéticos en condiciones del curado y de esta manera obtener información sobre el impacto del proceso de curado sobre la actividad catalítica de la β -glucosidasa.

Durante el sudado las vainas de vainilla se encuentran en una temperatura cercana a los 30°C, debido a esto se llevo a cabo la reacción a pH 6.2 y 30 °C para conocer el comportamiento de la enzima en estas condiciones.

En el primer paso del curado de vainilla (etapa de marchitez ó killing) se sumergen las vainas durante 3 minutos en agua caliente a 60 °C (Mariezcurrana et al., 2008), por lo que se llevó a

cabo la reacción a esta temperatura para evaluar la influencia de ésta en la actividad de la enzima.

Un tratamiento equivalente en la etapa de marchitez es sumergir las vainas de vainilla en agua caliente a 80 °C por un tiempo de 10 segundos (Mariezcurrana et al., 2008), aunque es un tiempo corto, la temperatura es elevada considerablemente ya que se encuentra 40 °C por encima de la temperatura en la cual la β -glucosidasa manifiesta su actividad catalítica óptima

En las lecturas de absorbancia se detectó un valor negativo en el primer punto de la curva, por esa razón en el gráfico de velocidad correspondiente a las condiciones de 80 °C se obtiene un valor negativo, la temperatura elevada que generó una desnaturalización parcial de la enzima y aunado a eso la concentración baja de sustrato no dieron lugar a la reacción de manera cuantitativa y como consecuencia las lecturas en la absorbancia dieron resultados negativos.

Durante el sudado de las vainas de vainilla, etapa posterior al marchitado en la cual las vainas son secadas en el sol durante las mañanas y a la sombra durante la tarde, únicamente el 40 % de la glucovainillina presente es hidrolizada a vainillina (Odoux et al 2003).

El incremento en el pH de 4.0 a 6.2 afectó la selectividad de la β -glucosidasa ya que la K_m se incrementó de 219 μ M a 284 μ M, es decir, que requiere mayor cantidad de sustrato para alcanzar la mitad de su velocidad máxima, sin embargo la V_{max} se mantuvo constante. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la optimización de pH, en el cual se concluyó que el pH óptimo de actividad de la enzima en estudio fue de 4.

La información acerca de la estabilidad térmica de la β -glucosidasa es de gran importancia, aunado a un mejor conocimiento de la estabilidad de la enzima bajo las condiciones de curado puede ayudar en la optimización del proceso de curado para incrementar la hidrólisis de glucovainillina y como consecuencia mayores rendimientos durante la extracción de vainillina.

Algunos estudios muestran la pérdida de actividad de la β -glucosidasa durante el proceso comercial de curado de vainilla a pH 6, un valor muy cercano al de las vainas (pH 6.2). Estos métodos generan pérdidas significativas de la enzima.

Después de una exposición a 60 °C durante 3 minutos hace que se pierda un 51 % de actividad, mientras que se pierde 60 % de actividad a 70 °C por 90 segundos y 48 % de pérdidas al exponerlas a 80 °C por 90 segundos y 80°C (Márquez 2008). Estos resultados indican la pérdida significativa de la enzima durante el marchitado del proceso de curado.

Debido a que la β -glucosidasa es la responsable de la hidrólisis de glucovainillina, las técnicas de curado deben preservar la actividad enzimática tanto como sea posible (Márquez 2008).

Estos resultados justifican la necesidad de estudiar otras técnicas de marchitado de las vainas de vainilla durante el proceso de curado que permitan una correcta ruptura celular y que limite la pérdida de actividad de la β -glucosidasa.

El mecanismo de hidrólisis de la glucovainillina en vainas de vainilla es regulado por la compartimentación y el nivel de actividad enzimática no es el factor limitante para la completa hidrólisis. Si una total des compartimentación es obtenida, una completa hidrólisis es observada incluso si se ha perdido una parte de actividad de la β -glucosidasa. El nivel de actividad de la enzima solamente tiene efecto sobre la cinética de la hidrólisis de la glucovainillina (Odoux et; al 2006).

Probablemente un marchitado por medio de congelación sea más adecuado ya que al tercer día después de un tratamiento a -10 °C por un lapso de 24 horas la membrana celular se rompió generando espacios intercelulares que facilitan la interacción de la enzima con el sustrato (Mariezcurrana et; al 2008).

3.9 Inhibición por producto (Vainillina, Glucosa)

Muchas sustancias alteran la actividad de una enzima al combinarse con el mismo en una forma que afecta la fijación del sustrato y/o su número de recambio. Las sustancias que reducen la actividad de una enzima de esta forma se denominan inhibidores (Voet, 2006)

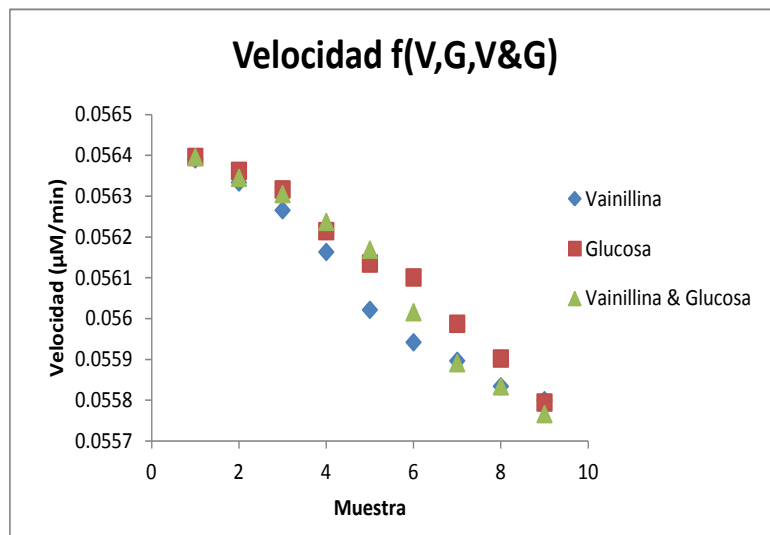
Los productos de reacción en el proceso de curado de la vainilla son: vainillina y glucosa principalmente (Márquez et; al 2008).

La tabla 3 y el gráfico 10 muestran las velocidades de reacción en función del incremento gradual de concentración de producto de reacción, durante el beneficio de las vainas de vainilla.

Muestra	Concentración μM (Glucosa,vainillina)	Velocidad en función de [vainillina]* ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Velocidad en Función de [Glucosa]* ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Velocidad en Función de [Vainillina+ Glucosa]* ($\mu\text{M}/\text{min}$)
1	0	0.056	0.056	0.056
2	0.66	0.056	0.056	0.056
3	6.64	0.056	0.056	0.056
4	13.28	0.056	0.056	0.056
5	33.2	0.056	0.056	0.056
6	66.4	0.055	0.056	0.056
7	132.8	0.055	0.055	0.055
8	332	0.055	0.055	0.055
9	664	0.055	0.055	0.055
		[]* Concentración		

Tabla 3. Variaciones de velocidad por la presencia de inhibidores
(vainillina, glucosa y conjuntas)

Muchos inhibidores son sustancias que se parecen estructuralmente al sustrato de la enzima pero que o bien no reaccionan o reaccionan muy lentamente en comparación con el sustrato (Voet, 2006).



V (vainillina), G (glucosa), V y G (vainillina + glucosa)

Gráfico 10. Disminución de Velocidades de reacción con los 3 diferentes inhibidores estudiados

3.10 Efecto de la vainillina sobre los parámetros cinéticos de la β -glucosidasa a pH 6,2, 40 °C

Debido a que se consideró que la vainillina presentó una mayor influencia en la actividad catalítica de la enzima en estudio, se realizó una curva cinética para conocer la influencia en los parámetros cinéticos.

En el Gráfico 11 se presenta la relación velocidad-concentración de sustrato a pH 6.2 ,40 °C , 664 μ M Vainillina.

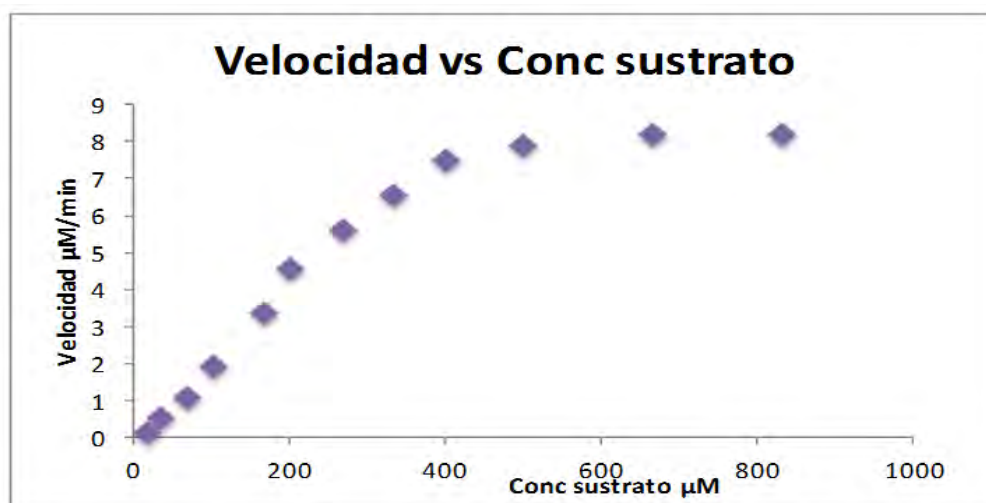


Gráfico 11. Curva cinética pH 6,2, 40°C, 664 μM vainillina

3.11 Efecto de la disminución de H_2O en la actividad enzimática de la β -glucosidasa

Para que una enzima desarrolle su funcionalidad debe estar soluble en agua al igual que el sustrato, de tal manera que entren en contacto, la interferencia de un disolvente orgánico miscible con el agua fue representativa ya que conforme se aumentó la proporción de acetonitrilo y se disminuyó la del agua, la actividad de la enzima decreció.

En la Tabla 4 se observan los efectos debidos a los cambios en la proporción de agua en el medio de reacción.

*A/H ₂ O	Abs 400nm	μM transformada de sustrato	Velocidad μM transformadas/min	μM/min U
0/100	0.670	2.621	0.524	3.495
5/95	0.530	2.070	0.414	2.760
15/85	0.158	0.600	0.120	0.800
20/80	0.145	0.550	0.110	0.733
25/75	0.128	0.480	0.096	0.640
40/60	0.109	0.408	0.081	0.544
60/40	0.102	0.379	0.075	0.506
80/20	0.099	0.369	0.073	0.492
90/10	0.096	0.357	0.071	0.476

*A(Acetonitrilo)

Tabla 4. Resultados obtenidos de la actividad en mezcla Acetonitrilo y agua de la β-glucosidasa.

Una disminución en el contenido de agua fue proporcional a la actividad de la enzima. La enzima perdió 20% de su actividad cuando la proporción de agua es del 95 %, y una pérdida de actividad hasta del 90 % cuando está en un medio con solo 10 % agua.

En el Gráfico 12 se representa la disminución en la actividad de la β-glucosidasa por la disminución en el contenido de agua.

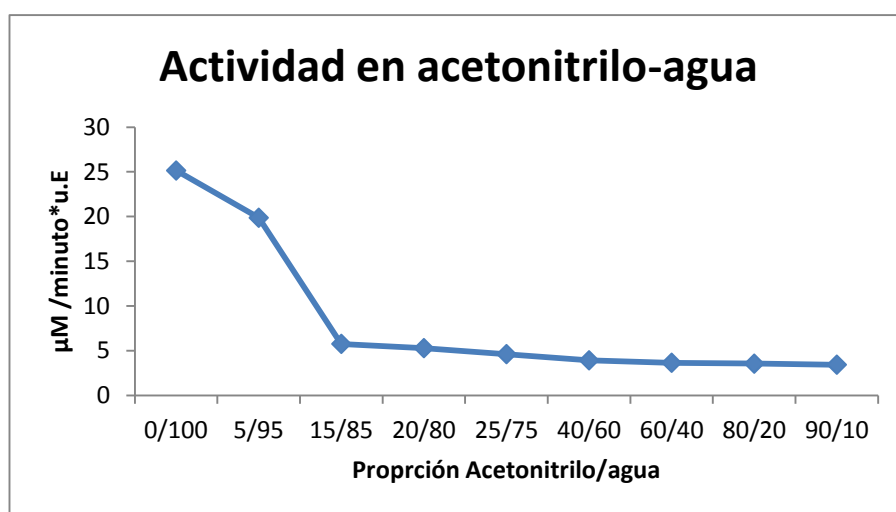


Gráfico 12. Cambio en la velocidad de reacción enzimática en función de la cantidad de agua en el medio de reacción.

3.11.1 Cinética enzimática al 90 %H₂O, pH 6,2, 40 °C

En la fase inicial de secado de las vainas evidentemente comienzan a deshidratarse, esta disminución de agua tiene efecto sobre la eficiencia catalítica de la β-glucosidasa. Por éste motivo se realizó un estudio para conocer la K_m y la V_{max} cuando se tiene 90 % agua en el medio de reacción.

Los resultados de los parámetros cinéticos obtenidos fueron los siguientes:

V max	7.42 μM/min
Km	305.62 μM

3.12 Curvas cinéticas a diferentes pH, temperatura, inhibidores y agua

En el gráfico 13 se integraron las velocidades obtenidas en cada una de las curvas cinéticas para visualizar de mejor manera los límites en las V_{max} correspondientes a las diferentes condiciones de temperatura, pH, presencia de inhibidores y disminución de agua en el medio de reacción.

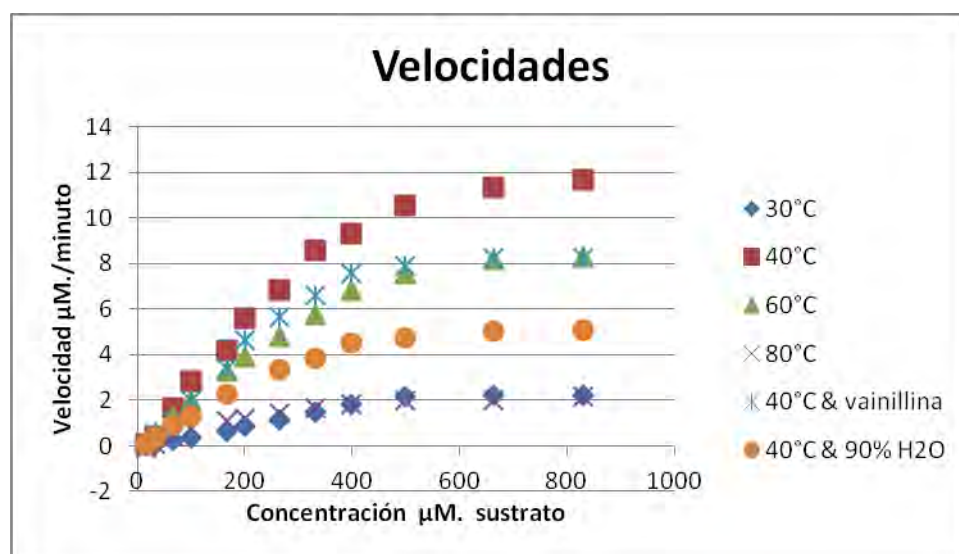


Gráfico 13. Integración de las velocidades correspondientes a los diferentes tratamientos

A 40 °C como se observa en el Gráfico 13 la enzima presentó el valor más alto de V max debido a que trabajó en su temperatura óptima generando una alta concentración de p-nitrofenol/min.

Temperaturas de 30 °C y 80 °C fueron los más influyentes en la velocidad de reacción, la enzima se saturó rápidamente en ambos casos debido a: 1) a que una temperatura de 30°C no es suficiente para que la reacción sea cuantitativa y en efecto la enzima generó menos p-nitrofenol, 2) 80°C es una temperatura considerablemente elevada y puesto que la enzima es una proteína se desnaturizó parcialmente generando de igual manera menor cantidad de p-nitrofenol y por consiguiente tanto a 30 °C como a 80 °C los valores obtenidos de Vmax fueron los más pequeños.

La segunda condición que más afectó a la enzima fue cuando se llevó a cabo la reacción con 90 % H₂O y 10 % de Acetonitrilo como se aprecia en el gráfico 12, debido a que la presencia de un disolvente orgánico impidió que la enzima y el sustrato interaccionaran en el medio por lo tanto la formación de producto no fue favorable.

Cuando la reacción se efectuó a 60 °C , a 40 °C y vainillina como inhibidor la V max decreció respecto a la reacción a 40 °C sin embargo estas dos condiciones fueron las que presentaron una menor influencia respecto a las descritas anteriormente.

Los parámetros cinéticos que se han reportado (Odoux et al 2003) fueron obtenidos a pH 6.5 y 38 °C de la β-glucosidasa proveniente de vainilla (*vanilla planifolia*) usando como sustrato p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido. Los valores obtenidos para Vmax y Km fueron 62.05 unidades y 2.07 mM respectivamente. Un valor de Km=1.1 mM para la enzima purificada fue reportada (Odoux et al., 2003). Km para β-glucosidasa de extracto crudo encontrado fue de 0.38 mM (Odoux et al., 2003) .Dignum et al (2004) reporta un valor de Km de 5 mM para la enzima en extractos crudos. Este resultado es más elevado que los mencionados anteriormente, probablemente porque el ensayo se llevó a cabo en otras condiciones (pH 7 y 30 °C).

Km obtenida en nuestro estudio fue de 0.28 mM a pH 6.2 y 40°C observando que se encuentra una unidad por abajo de 0.38 mM, estas diferencias pueden deberse a varios factores, por una parte la enzima con la que se trabajó en éste estudio es extraída de almendras y purificada, mientras que en el estudio de Odoux et al (2003) se realizaron las

cinéticas con β -glucosidasa proveniente de extracto de vainilla, matriz en donde se encuentra mayor número de impurezas y otros componentes que influyen en la interacción enzima-sustrato y por consiguiente en la reacción enzimática recordando que entre más pequeño sea el valor de K_m la enzima presenta mayor selectividad y por otra parte las condiciones de pH y temperatura fueron similares en ambos estudios.

En la Tabla 5 se resumen los resultados obtenidos de las cinéticas enzimáticas con el modelo de Michaelis-Menten.

Condiciones	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{minuto}$)
pH 6.2 40 °C 664 mM vainillina	248.36	11.42
pH 6.2 40°C ,90%H ₂ O	305.62	7.42
pH 6.2 30°C	210.76	2.88
pH 6.2 40°C	284.69	16.07
pH 6.2 60°C	356.51	12.46
pH 6.2 80 °C	195.18	2.63

Tabla 5. Resultados de los parámetros cinéticos estudiados V_{max} y K_m

Una alta purificación arroja parámetros cinéticos más precisos debido a que se excluyen constituyentes de la vainilla que puedan llegar a tener interacciones con la enzima. En un extracto crudo de la vainilla puede contener impurezas que en combinación con la β -glucosidasa produce cambios en la actividad enzimática. También la presencia de sustratos, cofactores y otros compuestos naturales presentes generan cambios en la actividad (Márquez et al 2008).

La referencia con la que se realizaron las comparaciones entre las constantes de Michaelis fue a pH 6.2 y 40 °C, el valor de pH debido a que es el que poseen las vainas de vainilla y 40 °C porque fue la temperatura óptima para la β -glucosidasa encontrada en el presente estudio.

Cuando la enzima fue sometida a condiciones de 30 °C, 40 °C + 664 μM de vainillina y 80 °C la constante de Michaelis disminuyó respecto a pH 6.2 y 40 °C, recordando que la relación

entre K_m y la afinidad de la enzima al sustrato es inversamente proporcional, dicha disminución en la K_m indica que se incremento la afinidad de la enzima por el sustrato en las condiciones mencionadas.

A 80 °C como se ha descrito anteriormente, la enzima se desnaturaliza parcialmente, es decir que el complejo enzima-sustrato formado es inferior al que ocurriría si la enzima se encontrara en su temperatura óptima, esto provoca una saturación más cercana de la enzima ocasionando una reacción de orden cero más rápidamente cuando son altas las concentraciones de sustrato, de este modo el cambio en la constante se debe a que como la V_{max} es pequeña y recordando que K_m es la concentración de sustrato en la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la máxima, evidentemente disminuyó su valor respecto al obtenido bajo una temperatura óptima.

Una temperatura de 30 °C también provocó una disminución en la K_m , esta temperatura está 10°C debajo de la óptima para la enzima, obtenida en este estudio (40 °C), por consiguiente el complejo enzima-sustrato no fue cuantitativo por la baja actividad de la enzima, así que de igual manera, la reacción se vuelve independiente de la concentración de sustrato, la enzima activa se saturó alcanzando una V_{max} pequeña y por consiguiente una K_m disminuida.

A 40 °C y una concentración de vainillina 664 μM , el complejo enzima-sustrato fue menor por la presencia de vainillina, la enzima sufrió una saturación rápida y la K_m en consecuencia también disminuyó.

A 60 °C la K_m aumentó respecto a la obtenida a 40 °C, es una temperatura en donde la desnaturalización parcial que tiene la enzima es menor que a 80 °C por lo que el complejo enzima-sustrato formado fue mayor que a 80 °C pero menor que a 40 °C, sin embargo, la afinidad hacia el sustrato es menor a 60 °C que a 40 °C y por esa razón la K_m aumentó, es decir se requiere mayor cantidad de sustrato para que la enzima alcance la mitad de su velocidad máxima a estas condiciones.

La presencia de un disolvente orgánico (acetonitrilo) modifica el medio en el que se encuentra la enzima, ya que aunque es un disolvente miscible con el agua no es de la misma naturaleza química e interfiere en que la enzima presencie un ambiente químico adecuado para su función, la actividad disminuyó y se formó menor producto, de este modo la K_m se

incrementó debido a que la afinidad hacia el sustrato se vio desfavorecida por la proporción de agua al 90 % y 10 % de acetonitrilo. Se adicionó una proporción de acetonitrilo para disminuir la cantidad de agua y demostrar que la enzima necesita estar en presencia de ésta para ejercer su función adecuadamente, durante el secado se va perdiendo agua y de esta forma es como también la enzima deja de generar vainillina.

Algunos estudios han sugerido la congelación como una alternativa viable en lugar del tratamiento térmico ya que el tamaño de los cristales tras una congelación lenta llega a romper la membrana celular favoreciendo la interacción enzima-sustrato sin generar pérdidas importantes de actividad como los tratamientos térmicos, la inmersión en etanol remueve el agua de las células induciendo a la deshidratación, las células se colapsan y mueren (Mariezcurrana et al., 2008).

CONCLUSIONES

El presente estudio de la β -glucosidasa reveló información importante sobre la enzima, sin embargo no se puede concluir que dichos resultados son absolutos, tal que se trata de una aproximación al comportamiento de la enzima en vainas de vainilla debido a que existen cambios en la actividad catalítica, al no tratarse de la misma matriz; a nivel laboratorio se trabajó con una enzima purificada extraída de almendras mientras que en las vainas de vainilla existen otros componentes químicos que generan ligeros cambios en la actividad por la posible interacción entre estos con la enzima.

La temperatura y la cantidad de agua en el medio de reacción fueron los factores más influyentes en la actividad de la β -glucosidasa, a pesar de que la enzima durante el beneficio de la vainilla no actúa en el pH óptimo (4.0), realiza un buen desempeño al pH de las vainas (6.2).

La vainillina disminuyó más la velocidad de reacción que la glucosa y la enzima perdió actividad un 86 %, cuando actuó en un medio con sólo 10 % agua, lo cual resulta relevante puesto que una de las etapas del proceso de curado es la exposición al sol con la finalidad de propiciar la pérdida de agua.

Las pérdidas de actividad enzimática son significativas durante los tratamientos térmicos comúnmente utilizados en el proceso de curado, por ésta razón es necesario buscar otras técnicas para la ruptura de la membrana celular que no afecten en gran medida a la enzima para obtener rendimientos mayores de vainillina.

AGRADECIMIENTOS

Éste trabajo se presentó en el Congreso de la Sociedad Química de México 2013 que se llevó a cabo en Guanajuato, México del 31 de Agosto al 4 de Septiembre del presente año

Agradezco el apoyo financiero a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México dentro del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IT202812).

Agradecimiento al Subprograma 127, Formación básica en investigación, Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo financiero para la realización de ésta tesis.

BIBLIOGRAFÍA

Arboledas Brihuega David. Jerarquía estructural de las proteínas. Editorial Club Universitario. España 2011 15-32.

Arévalo Villena, J.F. Úbeda Iranzo, R.R. Cordero Otero, A.I. Briones Pérez. Optimisation of a rapid method for studying the cellular location of β -glucosidase activity in wine yeasts J Appl Microbiology, 99 (2005), 558–564

Cameron RG, Manthey JA, Baker RA, Grohmann K. Purification and characterization of a β -glucosidase from Citrus sinensis var. Valencia fruit tissue. J Agric Food Chem 2001;49:4457–62

Chiou TY, Lin YH, Su NW, Lee MH. β -Glucosidase isolated from soybeanokara shows specificity toward glucosyl Isoflavones. J Agric Food Chem 2010;58:8872–8.

Dignum M.J.W., Kerler J., Verpoorte R. (2001) β -glucosidase and peroxidase stability in crude enzyme extracts from green beans of Vanilla planifolia Andrews. Phytochemical Analysis, 12, 174-179.

Dignum, M.J., Heijden, R., Keler, J., Winkel, C. & Verpoorte, R. (2004). Identification of glucosides in green beans of Vanilla planifolia Andrews and Kinetics of vanilla β -glucosidase. Food Chemistry., 85, 199-205.

Food Chem 2001;49:4457–62 Sue M, Ishihara A, Iwamura H. Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (Secale cereale L.) seedlings. Plant Sci 2000;155: 67–74.

Mariezcurrera, M.D., Zavaleta, H.A., Waliszewski, K.N. & Sánchez, V. (2008). The effect of killing conditions on the structural changes in vanilla (Vanilla planifolia, Andrews) pods during the curing process. International Journal of Food Science and Technology, 43, 1452-1457.

Márquez & Krzysztof N. Waliszewski (2008). The effect of thermal treatment on β -glucosidase inactivation in vanilla bean (Vanilla planifolia Andrews). International Journal of Food Science and Technology, 43, 1993-1999.

Odoux, E. (2000). Changes in vanillin and glucovanillin concentrations during the various stages of the process traditionally used for curing *Vanilla fragrans* beans in Réunion. *Fruits*, 55, 119–125.

Odoux, E., Chauwin, A. & Brillouet, J. (2003). Purification and characterization of *Vanilla planifolia* Andrews β -D glucosidase. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 51, 3168-3173.

Odoux, E., Escoute, J.L (2006). The relation between glucovanillin, β -D-glucosidase activity and cellular compartmentation during the senescence, freezing and traditional curing of vanilla beans. *Annals of Applied Biology*, 149, 43-52.

Robert W. McGilvery. *Biochemical concepts*. W.B. Saunders Company. Philadelphia Editorial Reverte 3-15

Sue M, Ishihara A, Iwamura H. Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings. *Plant Sci* 2000;155:67–74.

Voet. 2006, Velocidad de las reacciones enzimáticas. En: María Inés Gismandó, Emilia Mas, Karen Mikkelsen, Ana María Pertierra, María Victoria Preciado, Silvia Rondinone, Daniel Pirolo eds. *Bioquímica*. S.L Madrid, España: Editorial Médica Panamericana 102-108.

Yang L, Ning ZS, Shi CZ, Chang ZY, Huan LY. Purification and characterization of an isoflavone-conjugates-hydrolyzing β -glucosidase from endophytic bacterium. *J Agric Food Chem* 2004;52:1940

http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/g0395pis.pdf

<http://apps.fao.org/faostat> Consulta de bases de datos de producción mundial y comercio internacional de Vainilla

www.siap.sagarpa.gob.mx Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP, SIACON, Anuario Agrícola por Municipio, SAGARPA. Consulta de Indicadores de Producción Nacional de Vainilla Beneficiada

www.infoaserca.gob.mx Revista Claridades Agropecuarias No. 101, Enero 2002

www.siap.sagarpa.gob.mx Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera
SIAP, SIACON, SAGARPA. Consulta de Indicadores de Producción Nacional de Vainilla
2001-2005

Instituto de Química, UNAM 2013, Ecuación de Michaelis-Menten (Actualizado 1 – octubre
2003).

Disponible en:

<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/ecuacion%20de%20michaelis.html>