



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE
TUXTLA GUTIÉRREZ**

RESIDENCIA PROFESIONAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA DEL POLO TECNOLÓGICO

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE DOS
ENZIMAS COMERCIALES A DIFERENTES pH, TEMPERATURA Y
CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO”**

PRESENTA: JOSÉ MANUEL CRUZ CRUZ

ASESOR INTERNO: DRA. SANDY LUZ OVANDO CHACÓN

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS A 31 DE MAYO DE 2013

ÍNDICE

	Página
1 INTRODUCCIÓN	7
2 JUSTIFICACIÓN	8
3 OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo General	9
3.2 Objetivos Específicos	9
4 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO	10
5 PROBLEMAS A RESOLVER	14
6 ALCANCES Y LIMITACIONES	15
7 MARCO TEÓRICO.....	16
7.1 Enzimas.....	16
7.2 Estructura química de las enzimas.....	16
7.3 Clasificación de las enzimas	18
7.4 Importancia de las enzimas.....	18
7.4.1 Celulasas.....	18
7.4.2 Pectinasa, poligalacturonidasa (pg) o pectino-depolimerasa	19
7.5 Factores que afectan la actividad enzimática.....	20
7.5.1 Concentración del sustrato	20
7.5.2 Temperatura	21
7.5.3 pH	22
7.5.4 Inhibidores	22
7.6 Cinética enzimática	24
7.6.1 Determinación de las constantes cinéticas	27
7.7 Enzimas comerciales.....	28
7.7.1 Cellulase	28
7.7.2 Viscozyme L	30
7.7.2.1 Especificaciones	30

7.7.2.2 Aspectos de seguridad	30
7.7.2.3 Aplicación.....	31
7.7.2.4 Servicio técnico.....	31
8 METODOLOGÍA.....	33
8.1 Determinación de Azúcares reductores.....	33
8.2 Actividad Celulasa, ensayo con papel filtro (FPU)	34
8.2.1 Efecto de la temperatura.....	35
8.2.2 Efecto del pH	35
8.2.3 Efecto de la concentración de sustrato	35
8.3 Actividad Pectinasa	36
8.3.1 Curva estándar de ácido galacturónico.....	36
8.3.2 Efecto del pH	36
8.3.3 Efecto de la temperatura.....	37
8.3.4 Efecto de la concentración de sustrato	37
9 RESULTADOS Y DISCUSIONES	38
9.1 Actividad celulasa.....	38
9.1.1 Efecto del pH.....	38
9.1.2 Efecto de la temperatura	40
9.1.3 Efecto de la concentración de sustrato.....	41
9.1.4.1 Lineweaver-Burk para celulasa.....	42
9.2 Actividad Pectinasa	44
9.2.1 Efecto del pH.....	44
9.2.2 Efecto de la temperatura	45
9.2.3 Efecto de la concentración de sustrato.....	47
9.2.3.1 Lineweaver-Burk para pectinasa	48
10 CONCLUSIONES.....	50
11 RECOMENDACIONES	51
12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
13 NEXOS	53
13.1 Curva	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación internacional de las enzimas	18
Tabla 2 Solución DNS	33
Tabla 3 Soluciones testigo	35
Tabla 4 Velocidad de reacción a diferentes niveles de pH	38
Tabla 5 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción	40
Tabla 6 Cálculos de la velocidad de reacción	41
Tabla 7 Inversos para la linealización	42
Tabla 8 Cálculos de la velocidad de reacción	44
Tabla 9 Cálculo de la velocidad de reacción	46
Tabla 10 Cálculo de la velocidad de reacción.	47
Tabla 11 Inversos para linealizar	48
Tabla 12 Datos para la obtención de la curva patrón glucosa.....	53
Tabla 13 Datos para la obtención de la curva patrón glucosa.....	54
Tabla 14 Datos para curva patrón de ácido galacturónico.	56
Tabla 15 Datos para la curva patrón de ácido galacturónico	58
Tabla 16 Datos para la curva patrón de glucosa	59
Tabla 17 Datos de cálculo de velocidad de reacción	59
Tabla 18 Datos para calcular velocidad de reacción	60
Tabla 19 Datos para la curva patrón de glucosa dos	60
Tabla 20 Cálculo de velocidad de reacción	61
Tabla 21 Datos para curva patrón de ácido galacturónico	61
Tabla 22 Cálculo de velocidad de reacción.....	61
Tabla 23 Cálculo de la velocidad de reacción	63
Tabla 24 Datos para la curva patrón de ácido galacturónico dos	63
Tabla 25 Cálculo de la velocidad de reacción	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Reacción enzimática	24
Figura 2 Gráfico de comportamiento M-M.....	26
Figura 3 Gráfico de dobles recíprocos	27
Figura 4 Gráficos de actividad celulasa.....	28
Figura 5 Efecto del pH sobre la velocidad de reacción	39
Figura 6 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción.....	40
Figura 7 Respuesta de la celulasa frente a la concentración de sustrato	41
Figura 8 Curva de Lineweaver para Cellulase.....	42
Figura 9 Gráfica del pH frente a la velocidad de reacción.....	44
Figura 10 Respuesta de viscozyme L frente a la velocidad de reacción	46
Figura 11 Grafico del efecto de la concentración de sustrato frente la actividad enzimática	47
Figura 12 Gráfico de Lineweaver para la actividad pectinasa	48
Figura 13 Curva patrón de glucosa	53
Figura 14 Curva patrón de glucosa 2.	54
Figura 15 Curva patrón de ácido galacturónico.....	56
Figura 16 Curva patrón dos de ácido galacturónico	58

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos pueden obtener y gastar la energía muy rápidamente debido a la presencia de catalizadores biológicos llamados enzimas. Como sucede con los catalizadores inorgánicos, las enzimas modifican la velocidad de una reacción química sin afectar el equilibrio final; y sólo se requieren pequeñas cantidades para efectuar la transformación de un gran número de moléculas de sustrato. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de los catalizadores inorgánicos, las enzimas son bastante específicas, ya que catalizan un número comparativamente pequeño de reacciones y en algunos casos tan solo una reacción. Así mismo, las enzimas funcionan solamente bajo condiciones muy definidas de pH, temperatura, concentración de sustrato, cofactores, etc.

La celulosa es el bpolímero más abundante en la naturaleza y el constituyente principal de la pared celular de los tejidos vegetales; se degrada por algunos microorganismos tales como bacterias, protozoos y ciertos hongos filamentosos (Marquina 2005). Muchos materiales lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina) son una fuente para la producción de algunos productos de alto valor agregado. Su interés a nivel industrial se basa en su aplicación directa o indirecta para la producción de energía limpia, abundante y descentralizada. Así mismo, se utiliza en la obtención de azúcares fermentables por la degradación de sus compuestos y la producción de biocombustible (Monsalve 2006)

En el presente trabajo se evaluó la actividad enzimática de dos enzimas comerciales, celulasa y vizcozyme L, usando en el caso de celulasa metodología estandarizada por la JUPAC llamada FPU (filter paper assay) y ajustándola para encontrar su temperatura, pH y concentración de sustrato de mayor actividad. Para la vizcozyme L se evaluó su actividad pectinasa para encontrar su temperatura, pH y concentración de sustrato de mayor actividad.

2. JUSTIFICACIÓN

Durante el almacenamiento las enzimas pierden su actividad, debido al “envejecimiento”, por lo que después de un periodo de compra es necesario re-evaluar su actividad para seguir obteniendo los resultados óptimos en los procesos de aplicación. Por este motivo se realizó este trabajo para aprovechar al máximo el tiempo de utilidad de estas enzimas, determinando las condiciones de, pH, temperatura y concentración de sustrato, de mayor actividad.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar las condiciones óptimas de pH, temperatura y concentración de sustrato para una máxima actividad enzimática de dos enzimas comerciales.

3.2 Objetivos Específicos

- Revisión de artículos relacionados con el tema
- Estandarizar la metodología a usar
- Evaluación del efecto del pH, temperatura y concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de dos enzimas comerciales.
- Determinación de las condiciones óptimas de pH, temperatura y concentración de sustrato

4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO

El proyecto se llevó a cabo en los laboratorios de Investigación y en el Polo Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas de Biocombustibles, localizados en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, ubicado en Carretera Panamericana Km 1080, bajo el cargo del Ing. José Luis Méndez Navarro.

El laboratorio de Investigación cuenta con cámara de inoculación, microscopios, incubadoras, balanzas analíticas, estufas de secado y de vacío, autoclaves, cámaras de refrigeración, materiales de vidrio, mecheros, reactivos, refractómetros, parrillas de calentamiento, equipos de destilación (Corning), etc.

En el Polo Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas de Biocombustibles cuenta con equipos para evaluar la densidad y viscosidad (Viscosímetro SVM 3000 Stabinger®), refrigeradores y equipos de destilación (Corning marca Pyrex®). También cuenta con laboratorios individuales destinados para recepción de materia prima, cromatografía, destilación, espectroscopia infrarroja, microbiología, etc.

El Polo Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas de Biocombustibles se encuentra dentro del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en Carretera Panamericana Km 1080 de esta ciudad.

A. Políticas y normas

Ser una oferta educativa tecnológica suficiente a nivel superior y postgrado, en las modalidades escolarizadas y abiertas, con perfiles profesionales acorde a los retos de todas las regiones del país.

Compartir con la población en general los beneficios de conocimiento, la cultura científica y tecnológica; en particular, proporcionar al público, con la finalidad de coadyuvar al modelo de desarrollo que el país reclama, para alcanzar el bienestar social que demandamos los mexicanos.

B. Objetivos de la institución

Promover el desarrollo integral y armónico del educando con los demás, consigo mismo y con su entorno, mediante una formación intelectual que lo capacite en el manejo de los métodos y los lenguajes sustentados, en los principios de identidad nacional, justicia, democracia, cultura, que le permiten una mente y cuerpo sanos.

C. Servicios que presta la institución

- Atender la demanda de educación superior y postgrado con alta calidad nacional e internacional en las áreas industriales, agropecuarias y de servicios, en todas las regiones del país, como la forma de auspiciar el desarrollo regional.

Se imparten 8 carreras a nivel Licenciatura, las cuales son: Ingeniería Bioquímica, Ingeniería Eléctrica, Ingeniería Electrónica, Ingeniería Industrial, Ingeniería Mecánica, Ingeniería Química, Ingeniería en Gestión Empresarial e Ingeniería en Sistemas Computacionales. Además se oferta el postgrado con la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y la Maestría en Ciencias en Ingeniería en Mecatrónica.

- Hacer de cada uno de los institutos Tecnológicos un instrumento de desarrollo mediante una estrecha y permanente retroalimentación con la comunidad, en especial entre los sectores productivos de bienes y servicios, sociales, públicos y privados.
- Promover y convocar a los sectores productivos y educativos de cada localidad para generar y otorgar apoyos materiales y financieros adicionales, requeridos en la operación de los planteles.
- Compartir con la comunidad la cultura científica tecnológica y humanista, así como la recreación y el deporte, mediante los diversos foros y medios con que cuenta el sistema.
- Oferta de perfiles profesionales que integran las necesidades específicas regionales, para que el egresado contribuya de manera satisfactoria al desarrollo de cada comunidad, en especial a la planta educativa.

- Actualizar de manera permanente al personal docente y administrativo, para favorecer el desarrollo armónico entre toda la comunidad tecnológica.

D. Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica

Este departamento se encarga de planear, coordinar, controlar y evaluar las actividades de docencia, investigación y vinculación en las áreas correspondientes a la Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico, de conformidad con las normas y lineamientos establecidos por la Secretaría de Educación Pública, además de elaborar el programa educativo anual y el anteproyecto de presupuesto del departamento y presentarlo a las Subdirección Académica para lo conducente.

También se encarga de aplicar la estructura orgánica autorizada para el departamento de procedimientos establecidos.

E. Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica

Las funciones del departamento son múltiples por lo que tiene que coordinarse con otros departamentos:

- Coordinar con las divisiones de estudios profesionales y postgrado e investigación, la aplicación de programas de estudios y con el departamento de desarrollo académico, los materiales y apoyos didácticos a las asignaturas de las correspondientes a las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparten en Instituto Tecnológico y controlar el desarrollo.
- Coordinar con la división de estudios profesionales y postgrado e investigación, con el departamento de desarrollo académico, la formulación y aplicación de técnicas e instrumento para la evaluación del aprendizaje de las asignaturas correspondientes en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico.
- Coordinar los proyectos de investigación educativa, científica y tecnológica

en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se llevan a cabo en el Instituto Tecnológico con el sector productivo de bienes y servicios de la región, así como controlar su desarrollo.

- Proponer a la Subdirección Académica el desarrollo de recurso y eventos que propicie la superación y actualización profesional del personal docente de las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica, en el Instituto Tecnológico.
- Apoyar a la División de Estudios Profesionales en el proceso de titulación de los alumnos del Instituto.
- Superar y evaluar el funcionamiento del departamento con las demás áreas y con base a los resultados, proponer las medidas que mejoren su operación.
- Coordinar las actividades del departamento con las demás áreas de la Subdirección Académica.
- Presentar reportes periódicos de las actividades desarrolladas a la Subdirección Académica.

En el área de Ingeniería Bioquímica se cuenta con laboratorios, los cuales son utilizados para realizar las actividades experimentales correspondientes a las distintas materias impartidas en la institución, así como para la realización de proyectos de investigación que se llevan a cabo dentro del área.

El presente proyecto de residencia profesional fue realizado en los laboratorios de Biotecnología e Investigación ya que cuentan con los servicios y materiales necesarios para la realización de dicho trabajo.

5. PROBLEMAS A RESOLVER

Las enzimas son catalizadores biológicos lo que hace que las reacciones ocurran en un corto tiempo; todas las enzimas tienen una temperatura (T), pH y concentración de sustrato [S] óptimas, en estas condiciones óptimas tienen una mayor actividad.

En este proyecto se pretende encontrar las condiciones óptimas (T, pH y [S]) de dos enzimas comerciales (Cellulase y Viscozyme L) usando metodología basada en artículos científicos.

6. ALCANCES Y LIMITACIONES

Las enzimas comerciales, celulasa y viscozyme L, son usadas por su actividad celulasa y pectinasa respectivamente, por lo que tienen muchos usos desde ser enzimas clarificantes de jugos(pectinasas), detergentes quita pelusas (celulasas), hasta para que la fermentación de las semillas de café sea más rápida (pectinasas) ya que logra separar las partículas de pericarpio aún adheridas a las semillas. Pero estas enzimas comerciales con el paso del tiempo van perdiendo su capacidad catalítica, es por eso que se deben evaluar cada cierto tiempo para saber las condiciones de pH, temperatura y concentración de sustrato [S] en las que tienen mayor actividad. Con estas evaluaciones se logra tener bases para usar las enzimas y así poder manejarlas de manera adecuada y no desperdiciar reactivos. Uno de los limitantes es que estas evaluaciones se tienen que hacer cada cierto tiempo para tener siempre actualizada la información de estas enzimas. Otro limitante es que los aparatos usados deben de ser muy exactos, en el caso del baño utilizado tenía pequeñas variaciones en la temperatura que se le indicaba durante la incubación, lo cual pudo afectar los resultados obtenidos.

7. MARCO TEÓRICO

7.1 ENZIMAS

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles. Un catalizador es una sustancia que disminuye la energía de activación de una reacción química. Al disminuir la energía de activación, se incrementa la velocidad de la reacción. Una enzima hace que una reacción química que es energéticamente posible pero que transcurre a una velocidad muy baja transcurra a mayor velocidad que sin la presencia de la enzima. Las enzimas reaccionan sobre sustratos para agilizar la producción de productos. Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación (ΔG^\ddagger) de una reacción, de forma que se acelera sustancialmente la tasa de reacción. Las enzimas no son consumidas por las reacciones que catalizan, ni alteran su equilibrio químico. Sin embargo, las enzimas difieren de otros catalizadores por ser más específicas. Los inhibidores enzimáticos son moléculas que disminuyen o impiden la actividad de las enzimas, mientras que los activadores son moléculas que incrementan dicha actividad (Badui 1999).

7.2 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS ENZIMAS

Todas las enzimas son proteínas globulares, que tienen pesos moleculares muy elevados, por lo que su tamaño es muy grande mucho mayor que el de la molécula sobre la que actúa a la que se denomina sustrato.

Son solubles en agua y se difunden fácilmente en los líquidos orgánicos.

Excepcionalmente existen algunas moléculas de ARN, denominadas ribozimas que también tienen función catalítica (Bustamante 2007)

Según su composición molecular las enzimas pueden ser de dos tipos:

- Enzimas que son proteínas simples u holoproteínas, las cuales están formadas únicamente por una o varias cadenas de aminoácidos. Son poco frecuentes, un ejemplo lo constituye la ribonucleasa que cataliza la hidrólisis del ARN

- Enzimas que son proteínas conjugadas o heteroproteínas, estas representan la mayoría, también se denominan holoenzimas. En ellas se diferencia: una parte proteica llamada apoenzima y una parte no proteica denominada cofactor.

El cofactor puede ser de distinta naturaleza:

- ✓ Pueden ser cationes metálicos como: Fe^{++} , Mg^{2+} , Cu^{2+} etc. Ej. la citocromo oxidasa que tiene como cofactor un átomo de hierro y uno de cobre.
- ✓ Pueden ser moléculas orgánicas complejas, en este caso se denominan:
 - Coenzimas si se unen débilmente y de forma temporal al apoenzima, por ejemplo el NAD^+ , FAD , etc., algunos de ellos tienen en su composición una vitamina.
 - Grupo prostético si se unen mediante enlaces covalente y de forma permanente al apoenzima, por ejemplo el grupo hemo del citocromo c.

Tanto la apoenzima como el cofactor son inactivas por sí mismas, deben de estar unidas para que la enzima (holoenzima) sea activa. El apoenzima determina la especificidad de la reacción, es decir determina el sustrato sobre el que puede actuar, mientras que el cofactor presenta los grupos que permiten la transformación del sustrato. Un mismo cofactor puede ser constituyente de diferentes holoenzimas.

7.3 CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS

Las enzimas se clasifican de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan (tabla 1). Todas las enzimas tienen un número y nombres formales del sistema E.C. (Enzyme Commission) y la mayoría tienen nombres sencillos.

Tabla 1. Clasificación internacional de las enzimas

N°	Clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidorreductasas	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H)
2	Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales de agua)
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas.
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N mediante reacciones acopladas a la rotura de ATP.

Fuente: Lehninger

7.4 IMPORTANCIA DE LAS ENZIMAS

7.4.1 CELULASAS

Las celulasas son enzimas hidrolíticas que participan en la ruptura de los enlaces glucosídicos β -1,4 presentes en los polisacáridos de celulosa. El interés por las celulasas empezó alrededor de los años 50 debido a su enorme potencial para convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles. Cabe señalar que la lignocelulosa es la fuente de energía renovable más abundante de la tierra. Está formada por tres componentes principales que son: celulosa, hemicelulosa y lignina, y su contenido es bajo en cenizas, proteínas, grasas y ceras (Paz 1995). Las celulasas son producidas por una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos y bacterias. La mayoría de los microorganismos celulolíticos son capaces de producir celulasas. La producción microbiana de estas enzimas está sujeta a diferentes mecanismos de regulación.

El término celulasas involucra un complejo de, por lo menos, tres actividades diferentes, las que a su vez existen en una multiplicidad de formas para llevar a cabo la hidrólisis total de la celulosa. De esta manera las endo- β -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.4) rompen al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, producen un rápido decremento en la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores libres. Las exo- β -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.91) remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un incremento rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero. Finalmente la β -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) hidroliza celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como producto final la glucosa (García 2003).

La biotecnología de las celulasas empezó al principio de los años 80, primero en la alimentación animal seguida por aplicaciones en la industria de alimentos. Posteriormente estas enzimas empezaron a usarse en las industrias de lavandería, textil y de la pulpa y papel.

7.4.2 Pectinasa, poligalacturonidasa (pg) o pectino-depolimerasa

Las pectinasas de uso comercial son de origen microbiano pueden ser de origen fúngico (*Aspergillus*, *Penicillium chrysogenum*) o bacteriano (*Bacillus*).

Estas enzimas actúan en el desdoblamiento hidrolítico de los enlaces glucosídicos de las cadenas de pectina o del ácido péctico a oligourónidos o a ácido galacturónico monómero (con reducción rápida de la viscosidad). Por lo general tienen un pH óptimo entre 3 - 6 las de origen fúngico y entre 5-8 las de origen bacteriano.

Las pectinasas tienen aplicación en el procesamiento de frutas y hortalizas para preparar jugos y néctares, formando también parte de las ya mencionadas "enzimas clarificantes", junto a la pectino-esterasa. También se emplea en la maceración de tejidos vegetales con el objeto de obtener aromas.

Por otra parte, en la fermentación húmeda de las semillas de café la adición ex profeso de preparados de pectinasa provenientes de levaduras, permiten reducir aproximadamente la décima parte del tiempo de fermentación previa del café para

lograr la separación final de las partículas del pericarpio aún adheridas a las semillas.

7.5 FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La eficacia de un enzima se mide por la velocidad de transformación del sustrato en producto. La actividad de las enzimas se ve afectada por diversos factores entre los que destacan los siguientes (Grajales 2005):

7.5.1 CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO

En toda reacción catalizada por una enzima, si se mantiene constante la concentración de la enzima [E], la velocidad de la reacción aumenta exponencialmente al incrementarse la concentración del sustrato [S], ya que al existir más moléculas de sustrato es más probable el encuentro con el enzima y la formación del complejo E-S.

Este aumento de velocidad es rápido para concentraciones bajas de sustrato y, a medida que este aumenta, se va haciendo más lento hasta que la concentración del sustrato alcanza un cierto valor, a partir del cual, aunque aumente la concentración del mismo, no aumenta la velocidad de la reacción. Esto es debido a que la enzima está saturada por el sustrato; es decir, todas las moléculas de la enzima están unidas al sustrato formando el complejo E-S. Cuando ocurre esto, se dice que la reacción ha alcanzado la velocidad máxima.

En 1913 Leonor Michaelis y Maud Menten estudiaron la variación de la velocidad de una reacción enzimática en función de la concentración del sustrato y propusieron la siguiente ecuación, que es válida para concentraciones de sustrato no saturante.

[S]

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Donde:

V es la velocidad de la reacción para una determinada concentración de sustrato.

V_{\max} es la velocidad máxima de la reacción.

[S] es la concentración del sustrato.

K_m es una constante denominada constante de Michaelis-Menten, es característica de cada enzima.

Si en la ecuación (1) hacemos $V = \frac{1}{2} V_{\max}$ y despejamos K_m obtenemos lo siguiente:

$$V_{\max}/2 = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]} ; \quad \frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} ; \quad K_m + [S] = 2[S] ; \quad K_m = [S]$$

K_m . Se puede definir como la concentración de sustrato necesario para que la velocidad de la reacción sea la mitad de la velocidad máxima. Se mide en unidades de concentración.

La K_m nos indica la afinidad de una enzima por su sustrato:

- Si el valor de K_m es alto indica que la enzima tiene poca afinidad por el sustrato ya que se necesita una concentración de sustrato elevada para alcanzar la mitad de la velocidad máxima.
- Si el valor de K_m es bajo indica que el enzima tiene mucha afinidad por el sustrato ya que se necesita una concentración de sustrato baja para alcanzar la mitad de la velocidad máxima.

7.5.2 TEMPERATURA

La temperatura influye en la actividad enzimática, en general por cada 10°C que aumente la temperatura la velocidad de la reacción aumenta de 2 a 4 veces. Esta regla se cumple hasta que la temperatura alcanza un valor máximo (temperatura óptima) donde la actividad es máxima. Esto se debe a que al aumentar la

temperatura aumenta la energía cinética de las moléculas y, por lo tanto aumenta la probabilidad de encuentro entre el S y la E.

Si la temperatura aumenta por encima de la temperatura óptima, la actividad enzimática disminuye e incluso cesa debido a que la enzima se desnaturaliza.

Cada enzima posee una temperatura óptima, en las enzimas humanas suele estar alrededor de 37°C. Los animales poiquiloterms debido a que carecen de mecanismos para regular la temperatura corporal, se ven obligados a hibernar en la estación fría pues la actividad de sus enzimas debido a las bajas temperaturas es muy baja.

7.5.3 pH

El pH es otro factor que influye en la actividad de las enzimas, debido a que el pH influye en la ionización de los grupos funcionales de los aminoácidos que forman la proteína enzimática. Cada enzima realiza su acción dentro de un determinado intervalo de pH, dentro de este intervalo habrá un pH óptimo donde la actividad enzimática será máxima. Por debajo del pH mínimo o por encima del pH máximo la enzima se inactiva ya que se desnaturaliza. En la mayoría de las enzimas el pH óptimo está próximo a la neutralidad, aunque hay excepciones.

7.5.4 INHIBIDORES

Son compuestos químicos que se unen a la enzima, en distintos puntos de la misma e incluso en el sitio activo y disminuyen o incluso impiden su actividad. Estos compuestos pueden ser de distintos tipos: iones, moléculas orgánicas y a veces el producto final de la reacción. A la acción que realizan se le denomina inhibición.

La inhibición puede ser de dos tipos reversible e irreversible:

- Inhibición irreversible: Cuando el inhibidor impide permanentemente la actividad enzimática, bien porque se une de forma permanente con grupos funcionales importantes del centro activo o bien porque altera su estructura. A estos inhibidores se les denomina venenos y a la inhibición que realizan se le denomina

envenenamiento del enzima. Ej. La penicilina que inhibe las enzimas que sintetizan la pared bacteriana. El ión cianuro actúa sobre la citocromo oxidasa (enzima respiratorio).

- Inhibición reversible: El inhibidor se une a la enzima de forma temporal mediante enlaces débiles e impide el normal funcionamiento del mismo, pero no la inutiliza permanentemente.

Puede ser de dos tipos:

- ✓ Competitiva: El inhibidor es similar al sustrato y se puede unir al centro activo del enzima impidiendo que lo haga el sustrato. Es decir ambos, inhibidor y sustrato compiten por unirse al centro activo del enzima. La acción suele anularse aumentando la concentración del sustrato

- ✓ No competitiva: El inhibidor no compete con el sustrato, puede actuar de dos formas:

- Sobre la enzima, uniéndose a esta en un lugar diferente al centro activo y modificando su estructura lo que dificulta que la enzima se pueda unir con el sustrato.

- Sobre el complejo E-S uniéndose a ésta y dificultando su desintegración y por lo tanto la formación de los productos.

7.6 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Las enzimas, como catalizadores que son, aceleran las reacciones químicas, pero ellas mismas no resultan irreversiblemente modificadas. El aumento de la velocidad se atribuye al descenso de la energía de activación de la reacción, en términos simples, esto se explica por la unión física del reactante a la enzima en un sitio activo, formando un complejo meta estable. La energía de activación para la ruptura de este complejo es considerablemente menor que para la ruptura del reactante solo. Partiendo de este sencillo concepto, se puede proponer el siguiente esquema de reacción (figura 1):

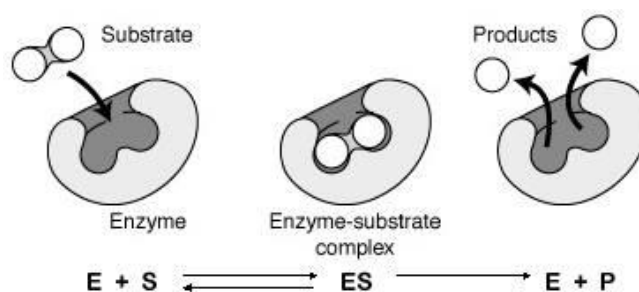
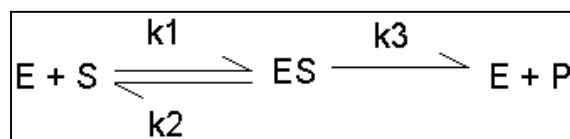


Figura 1. Reacción enzimática

La etapa del complejo se considera reversible, ya que el mismo tiene un estado energético semejante a la mezcla enzimática. La ruptura subsiguiente del complejo para rendir los productos se considera exotérmica, esta etapa puede ser prácticamente irreversible en muchos casos. La expresión de velocidad para este tipo de reacción se obtiene usualmente utilizando una hipótesis de estado estacionario, esto es, la concentración del complejo permanece constante (N 1980).



1

Aceptando la hipótesis de estado estacionario,

Formación de ruptura:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \quad (2)$$

Por lo tanto,

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (3)$$

Para que esta hipótesis sea válida, la velocidad de reacción debe ser lineal, por lo tanto se determina usualmente tan próxima al tiempo cero como sea posible, antes de que la concentración cambie apreciablemente (Velocidad inicial).

La ecuación anterior puede ser reordenada para dar:

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} = K_m \quad (4)$$

Donde K_m es la constante de Michaelis-Menten.

La ley de conservación de la masa requiere que la concentración de enzima $[E_0]$ no cambie.

$$[E_0] = [ES] + [E] \quad (5)$$

Por lo tanto,

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (6)$$

Sustituyendo 6 en la ecuación 4 y reordenando queda:

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{k_m + S} \quad (7)$$

Las dimensiones de esta expresión son unidades de concentración. La constante de velocidad k_2 es de primer orden y tiene unidades de tiempo⁻¹. Multiplicando ambos miembros de la ecuación 7 por k_2 se obtendrá la velocidad de cambio de la concentración de producto con el tiempo en función de la velocidad máxima posible, la constante de Michaelis y la concentración de reactante (P. Gacesa, "Tecnología de las Enzimas". 1990).

$$\frac{dP}{dt} = [ES] k_2 = \frac{[E_0][S] k_2}{K_m + [S]} \quad (8)$$

Que usualmente se escribe como La ecuación de Michaelis-Menten

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

Para predecir el comportamiento de un sistema enzimático es necesario determinar $V_{m\acute{a}x}$ y K_m para la enzima particular empleada. Esto puede realizarse midiendo la velocidad inicial de reacción en un rango de concentraciones de reactante. La ecuación 9 muestra que a valores de $[S]$ mucho menores que K_m la expresión puede simplificarse a:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m} \quad \text{Primer orden, ya que } K_m + [S] \approx K_m \quad (10)$$

Efecto de la concentración del reactante en la velocidad de una reacción catalizada por una enzima (figura 2).

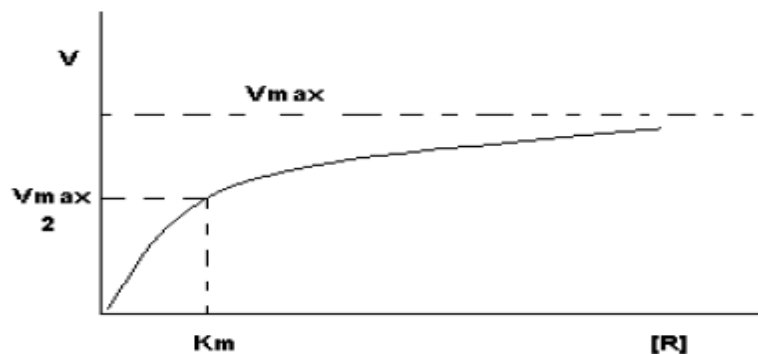


Figura 2. Gráfico de comportamiento M-M

A valores de $[S]$ mucho mayores que k_m , la ecuación anterior se aproxima a

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S]} \quad \text{Orden cero} \quad (11)$$

7.6.1 Determinación de las constantes cinéticas

La naturaleza hiperbólica de la curva de v frente a $[S]$ hace difícil la determinación de las constantes a partir de este sencillo gráfico. Existe una tendencia invariable a subestimar el valor de la V_{max} ; sin embargo sirve para demostrar la importancia de emplear un rango de concentraciones por encima y por debajo de k_m , para evitar obtener datos sólo de la región de primer orden o de orden cero. El método gráfico más ampliamente usado es la representación de dobles recíprocos, donde se toman los inversos de cada miembro de la ecuación 9 para obtener:

$$\frac{1}{v} = \frac{k_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (12)$$

Representando $1/v$ frente a $1/[S]$ se obtiene una relación lineal permitiendo la determinación de ambas constantes por regresión lineal. Sin embargo al tomar los inversos se atribuye la mayor significación a las velocidades obtenidas a baja concentración de reactivos, que están sujetas al mayor error experimental.

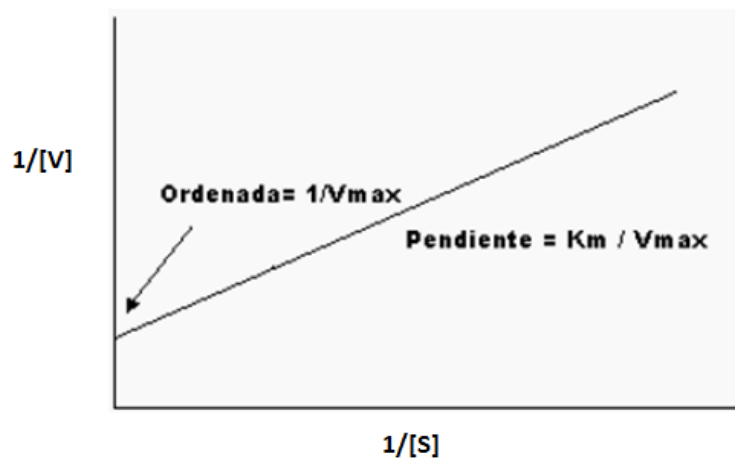


Figura 3. Gráfico de dobles recíprocos

7.7 ENZIMAS COMERCIALES

7.7.1 Cellulase

Cellulase es una enzima derivada de la fermentación de una cepa seleccionada de *Trichoderma longibrachatum*. Este producto se caracteriza por su capacidad de modificar, hidrolizar, o degradar la celulosa de hidratos de carbono. Cellulase contiene los tres enzimas activos (endo-y exo celulasa y las actividades beta glucosidasa) requeridas para lograr la hidrólisis de celulosa completa. Otras actividades secundarias significativas incluyen glucanasa, pectinasa y arabinoxilanasas. Las aplicaciones típicas incluyen la liberación de agua de enlace entre gomas adsorbentes, mejora la filtración, la reducción de la viscosidad, la degradación y la modificación de las gomas solubles y fibra y materiales de desagüe de envoltente matrices celulósicas. La Cellulase puede ser utilizada tanto para la hidrólisis parcial o completa, dependiendo de la dosis y las condiciones.

Características frente a pH y a temperatura (figura 4):

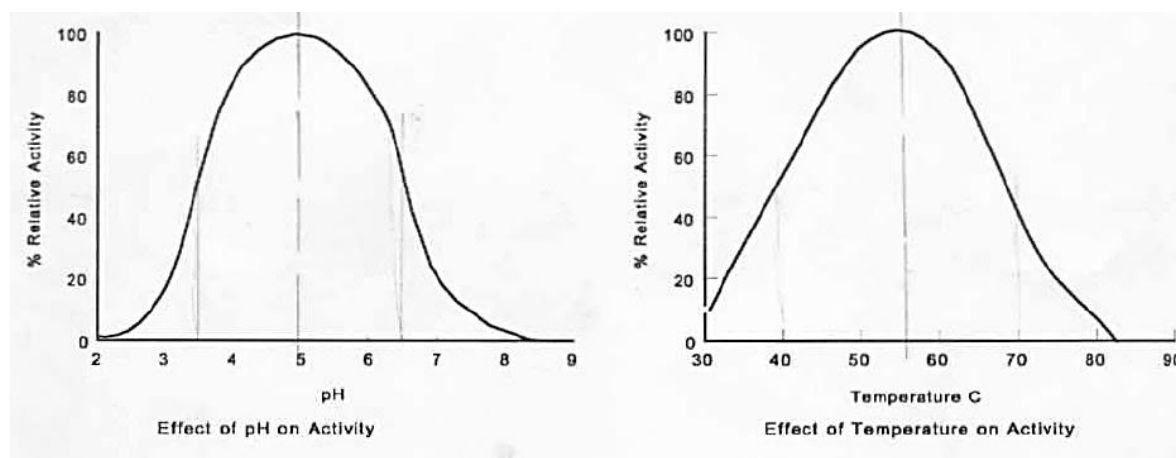


Figura 4. Gráficos de actividad celulasa.

Los gráficos nos indican que el mayor porcentaje de actividad se presenta a un pH de 5 y a una temperatura de 55°C.

- CELULASA se suministra como un polvo de color canela cual es fácilmente soluble en agua
- El producto ha sido estandarizada a 75.000 CU / g

- CELULASA se puede vender como una mezcla personalizada de cualquier graduación por debajo de 75.000 CU / g
- CELULASA se vende como producto GRAS y cumple con la actual de la FAO / OMS y las recomendaciones de la FCC para enzimas de calidad alimentaria.
- Este producto está esencialmente libre de proteasa, amilasa y lipasa.

ALMACENAMIENTO Y ENVASADO

Por favor, pregunte por nuestras opciones de paquetes disponibles.

Este producto se debe mantener en un lugar fresco y seco. El envase se debe mantener cerrado cuando no esté en uso. No se recomienda la exposición a alta humedad y Temperatura (Biocat).

7.7.2 Viscozyme L

Viscozyme L es un complejo multienzimático que contiene una amplia variedad de carbohidrasas, incluyendo arabanasa, celulasa, Q-glucanasa, hemicelulasa y xilanasa. La enzima también tiene actividad contra la pectina ramificada como sustancias que se encuentran en las paredes celulares de soja. La preparación de enzima se produce a partir de una cepa seleccionada del grupo *Aspergillus*.

Las condiciones óptimas para las actividades de este complejo enzimático son pH 3.3 a 5.5 y una temperatura de 40-50 ° C.

7.7.2.1 Especificaciones

Apariencia: Viscozyme L es un líquido de color marrón claro con una densidad de aproximadamente 1,2.

Actividad: Viscozyme L tiene una actividad declarada de 100 FBG / g. El método analítico está disponible bajo petición.

Almacenamiento: Cuando Viscozyme L se almacena a 25 ° C, la actividad declarada se mantiene durante al menos 3 meses. Para períodos de almacenamiento más largos, se puede producir una pérdida de 1.2% mensual. Cuando se almacena a 5 ° C, el producto se mantendrá la actividad declarada durante al menos un año.

7.7.2.2 Aspectos de seguridad

Estado de aprobación: Viscozyme L se produce de acuerdo a la FAO / OMS del JECFA y de las recomendaciones de FCC, complementado con un límite máximo de 102 / g para los moldes.

Precauciones de manejo: El producto no es inflamable, completamente miscible con agua y seguro cuando se utiliza de acuerdo con las instrucciones. Polvo de enzima puede causar sensibilización por inhalación.

Use las precauciones de manejo normales contra la inhalación de polvo del producto seco o de contacto corporal directo. En caso de derrame o contacto accidental con la piel o los ojos, enjuague con abundante agua.

7.7.2.3 Aplicación

Viscozyme L es una enzima especial que se utiliza en la ruptura de las paredes celulares para la extracción de los componentes útiles de los tejidos de las plantas y en el procesamiento de materiales de cereales y hortalizas.

La extracción de materiales a partir de las células vegetales puede ser mejorada mediante el pretratamiento del material vegetal con Viscozyme ya sea antes de la transformación convencional o como parte de un proceso de extracción a base de enzimas. La capacidad de la enzima para funcionar a bajas temperaturas se traducirá en una reducción de la demanda de energía para la extracción y la degradación de menos térmica de los materiales deseados. Además, la ausencia de niveles significativos de actividad de la amilasa y lipasa en la preparación significa que estos componentes principales de los materiales vegetales no se verán afectados durante el proceso de extracción. La naturaleza multi-componente de Viscozyme es de uso particular para el procesamiento de materiales de plantas en la industria de alcohol, cerveza, almidón y afines. La capacidad de la enzima para liberar materiales encuadrados y de degradar polisacáridos no amiláceos se puede utilizar para mejorar la disponibilidad de almidón en la fermentación y para reducir la viscosidad en general y por lo tanto mejorar los rendimientos.

Para la reducción de (3-glucanos se recomienda una tasa de dosis de 0,02-0,1% en peso del grano para moler. Para otras aplicaciones una recomendación preliminar es 0,05-0,1%.

7.2.4 Servicio Técnico

Grupo de aplicaciones industriales con experiencia de Novo Nordisk cuenta con laboratorios en los EE.UU., Japón, Asia Sur-Oriental, Suiza y Dinamarca, y estaremos encantados de ayudarle con más información sobre las propiedades y el uso óptimo de Viscozyme.

8. METODOLOGÍA

8.1 DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES

(Método modificado del ácido 3,5-dinitrosalicílico)

Este método colorímetro hace uso de la ley de Beer Lambert, en el azúcar reductor se presenta la oxidación de glucosa del grupo funcional aldehído presente y el grupo cetona en fructosa. Simultáneamente el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido a un compuesto nitroaminado colorido de pardo oscuro a marrón según la concentración de los azúcares (3,5-dinitrosalicílico) cuya intensidad de color se mide en el espectrofotómetro a 540nm. Esta técnica tiene la ventaja de ser un método preciso y rápido en comparación con los que utilizan derivados. En la tabla 2 se encuentra las cantidades necesarias de reactivos para preparar la solución DNS.

Tabla 2. Solución DNS

Agua destilada	100 mL
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	0.74 g
Hidróxido de sodio	1.38 g
Tartrato de sodio y potasio	10.8 g
Fenol	0.574 g
Metabisulfito de sodio	0.58 g

Pesar y medir todos los reactivos, mezclarlos y agitarlos hasta que la solución sea uniforme. Envasar en frasco ámbar y rotular con fecha de vencimiento (3 meses máximos), mantener en refrigeración.

Para la curva patrón, inicialmente se preparó una solución patrón de glucosa a concentración de 0.1 g/mL, para lo cual se pesó 0.01 g de glucosa grado reactivo en 10 mL de agua destilada. Se preparó una serie de tubos de ensayo con diferentes volúmenes 0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.45. y 0.50 mL de la solución patrón,

a cada tubo se le complementó el volumen a 0.5 mL con agua destilada. Posteriormente se le adicionó 0.5 ml de la solución DNS, se colocaron los tubos dentro de un vaso de precipitado de 1L con agua hirviendo, se hirvieron durante 5 min y se enfriaron rápidamente en baño de hielo. Ya fríos se les adicionó a cada tubo 5 mL de agua destilada. Se determinó la O.D. a 540 nm usando un blanco reactivo para ajustar a cero el espectrofotómetro. El blanco reactivo se preparó de la misma manera que las soluciones de glucosa, excepto la solución de glucosa se sustituyó por 0.5 mL de agua destilada. Se graficaron los resultados de las mediciones y se hizo una regresión lineal usando los datos de concentración y absorbancia para obtener una ecuación.

8.2 Actividad celulasa, ensayo con papel filtro (FPU)

Sustrato: Whatman No. 1 tira de papel de filtro, 0.5 x 3,0 cm (= 12.5 mg).

Método

Se preparó una solución buffer a pH 5 con acetato de sodio y ácido acético, una solución de enzima celulasa diluida con agua destilada (1:10). Se añadió 0.25 mL de la solución buffer pH 5 a 3 tubos de ensayo, posteriormente se adicionó 0.125 mL de la solución de enzima diluida. Se trasladaron los tubos a un baño maría a 50°C y se añadió el sustrato que fue una tira (hecha bolita) de papel filtro Whatman No. 1 con un peso aproximado de 12.5 mg. Se incubó durante 60 min. Se sacaron los tubos y se agregó 0.75 mL de solución DNS. Se hirvieron durante 5 min todas las muestras, incluyendo el blanco enzima y espectro cero y se enfriaron rápidamente en baño de agua fría. Se añadió 5 mL de agua destilada y se mezcló invirtiendo los tubos varias veces. Las muestras se dejaron reposar 20 min y se tomó la lectura de absorbancias en el espectro a una longitud de onda de 540 nm. Se usaron los siguientes testigos (tabla 3):

Tabla 3. Soluciones testigo

Blanco enzima	Espectro 0
0.25 ml sol. Buffer	0.375 ml sol. Buffer
0.125 ml de Enzima	0.75 ml DNS
0.75 ml DNS	

Nota: mismo tratamiento que las demás muestras. El espectro 0 se usó para ajustar el espectrofotómetro a absorbancia 0. Se restó el blanco enzima de las absorbancias medidas de las muestras (GHOSE 1987).

8.2.1 Efecto de la temperatura.

Se usó el método FPU, anteriormente mencionado. Con la diferencia que se hizo a diferentes temperaturas (30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 y 80), para obtener una gráfica de temperatura vs Vrxn. Para observar a qué temperatura hay mayor actividad.

8.2.2 Efecto del pH.

Se usó el método FPU, usando la temperatura en la que hubo mayor actividad, anteriormente. Con la diferencia que se hizo a diferentes pH (2, 3, 4, 5, 6 y 7) para obtener una gráfica de pH vs Vrxn. Para observar a qué pH hay mayor actividad de la enzima.

8.2.3 Efecto de la concentración de sustrato.

Se usó el método FPU, usando la temperatura y el pH de mayor actividad. Con la diferencia que se hizo a diferentes concentraciones de sustrato para obtener una gráfica de [sustrato] vs Vrxn. Para observar a qué [sustrato] hay mayor actividad de la enzima.

8.3 Actividad Pectinasa

8.3.1 Curva estándar de ácido galacturónico.

Para esta curva se preparó inicialmente una solución de ácido galacturónico con concentración de 1 g/L, para lo cual se pesó 0.1 g de ácido galacturónico y se colocó en un matraz aforado de 100 mL y se complementó el volumen con agua destilada. A partir de esta solución se prepararon otras soluciones con concentraciones de: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL.

En tubos de ensayo se adicionó 0.5 mL de ácido galacturónico con cada concentración preparada, además se le agregó 0.5 mL de solución DNS. Se colocaron los tubos en agua hirviendo durante 15 min, se enfriaron rápidamente en baño de hielo y se adicionó 4 mL de agua destilada a cada tubo. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm, se calibró con un blanco preparado de la misma manera que las soluciones de ácido galacturónico, excepto que se sustituyó la solución de ácido galacturónico por 0.5 mL de agua destilada. Con las mediciones obtenidas se realizó una gráfica de concentración de ácido galacturónico vs absorbancia, para hacer una regresión lineal y obtener la ecuación lineal. Todo lo anterior se hizo por triplicado para tener resultados más exactos.

8.3.2 Efecto pH

Se prepararon soluciones buffer a diferentes pH (4, 5, 6, 7, 7.5, 8,8.5 y 9) con acetato de sodio 1 N, ácido acético 1 N y ácido clorhídrico 0.1 N, aproximadamente un volumen de 100 mL para cada buffer. Se preparó una solución de enzima viscozime L diluida 1:10 con agua destilada. Una solución de pectina al 1 % p/v, agregando 1 g de pectina a 100 mL de agua destilada en un matraz.

Para medir la actividad pectinasa de la enzima viscozime L se hizo lo siguiente:

Se usaron ocho tubos de ensayo más dos tubos testigos. A los ocho tubos se les

añadió 1 mL de solución buffer a diferentes pHs, 0.1 mL de la solución de enzima y 1 mL de pectina al 1%. Posteriormente se incubó a 35° C por 60 min. Se sacaron los tubos de la incubadora y se les añadió a todos (incluyendo a los dos testigos) 0.5 mL de solución de DNS; se hirvieron 15 min y se enfriaron en baño de hielo. Después se agregó a cada tubo 4 mL de agua destilada y se mezclaron. Reposaron 15 min y se midieron a una longitud de onda de 510 nm. Para calibrar se usaron dos testigos o blancos preparados de la siguiente manera:

Blanco espectro:
2.1 mL de buffer pH 5
0.5 mL DNS

Blanco enzima:
2.0 mL de buffer pH 5
0.1 mL de enzima

Con las mediciones de absorbancias obtenidas se ingresaron a la ecuación obtenida en la curva estándar para ser pasadas a concentraciones de ácido galacturónico, para después ser convertidos a velocidad de reacción. Luego se hizo una gráfica de pH vs Vrxn para observar la actividad de la enzima a los diferentes pHs.

8.3.3 Efecto Temperatura

La temperatura se evaluó usando el método descrito para el pH con el que se presentó la mayor actividad. Además variando la temperatura de incubación (40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 y 80 °C. Se obtuvo una gráfica de T vs Vrxn para observar a qué temperatura hay mayor actividad (Gacesa 1990).

8.3.4 Efecto de la concentración de sustrato

La concentración de sustrato se evaluó del mismo modo usando el pH y la temperatura con el que se presentó la mayor actividad. Además variando la concentración del sustrato pectina (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL). Se obtuvo una gráfica de [Pectina] vs Vrxn. Para observar a qué concentración de pectina hay mayor actividad.

9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.1 ACTIVIDAD CELULASA

9.1.1 Efecto del pH

Los resultados que se muestran en la Tabla 4 se obtuvieron usando el método FPU con la diferencia de que se usaron soluciones con diferentes pHs.

Tabla 4. Velocidad de reacción a diferentes niveles de pH

Solución buffer (pH)	[glucosa(mg/mL)]	Vrxn (mg/mL*min)
2	0.0712	0.0581
3	0.0783	0.0640
4	0.0821	0.0670
5	0.0826	0.0675
6	0.0819	0.0669
7	0.0806	0.0659

La velocidad de reacción se calculó con la siguiente fórmula:

$$V_{RXN} = \frac{\frac{mg\ AR}{ml\ solución}}{\frac{0.125\ ml\ E}{Vol.\ Total\ de\ solución}} * 60min$$

La gráfica obtenida se muestra en la figura 5:

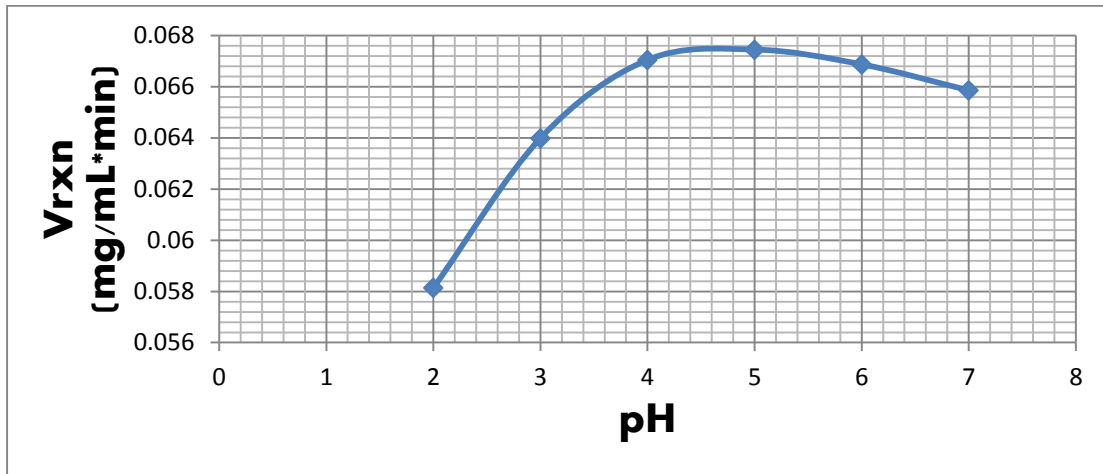


Figura 5. Efecto del pH sobre la velocidad de reacción

En la gráfica de la figura 5 se observa que la enzima celulasa tuvo la mayor actividad en condiciones de pH 4-6, obteniéndose la mayor a pH 5, hubo una diferencia poco significativa de 0.6% entre pH 4 y 5, por lo tanto, podemos decir que esta enzima es más eficiente en condiciones de neutras a ligeramente ácidas. La información de la ficha técnica de la enzima comercial nos indica que su pH óptimo es de 5, por lo tanto, coincide con los resultados obtenidos en esta evaluación.

9.1.2 Efecto de la temperatura

Los datos de la tabla 5 se obtuvieron usando el método FPU, con la diferencia de que se variaron las temperaturas para graficar su comportamiento.

Tabla 5. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción.

TEMPERATURA (°C)	[glucosa(mg/mL)]	Vrxn (mg/mL*min)
30	0.075799	0.061902
35	0.076035	0.062095
40	0.079014	0.064528
45	0.085016	0.069430
50	0.086024	0.070253
60	0.089347	0.072966
70	0.086903	0.070971
80	0.081244	0.066349

La gráfica obtenida se muestra en la Fig. 6:

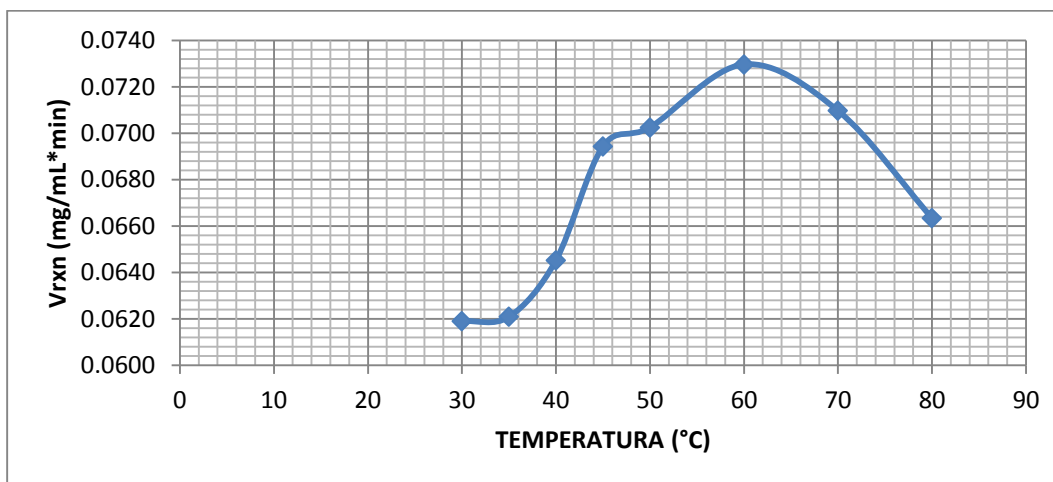


Figura 6. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción.

Al observar la gráfica de la figura 6 se aprecia una actividad estable entre 30 y 35° C, al llegar a los 40° C aumenta su actividad en un 3%, a 50° C tiene un mayor aumento debido a la energía proporcionada a través del calor y alcanza una mayor actividad celulasa a la temperatura de 60° C, al llegar a los 70° C empieza a disminuir su actividad indicando una desnaturalización de la enzima. Comparando los resultados con la información de la ficha de la enzima, la temperatura está

dentro del rango de mayor actividad aunque nos indica que es 55° C su mayor actividad, por lo que puede deberse a la incubadora que no mantenía la temperatura constante o que la enzima está perdiendo su poder catalítico y necesita de más energía por medio de calor.

9.1.3 Efecto de la concentración de sustrato

Habiendo determinado el pH y la temperatura donde se presenta la máxima actividad catalítica para la celulasa bajo estos mismos parámetros se evaluó la respuesta de la celulasa frente a la concentración de celulosa.

Tabla 6. Cálculos de la velocidad de reacción.

Sustrato celulosa(mg)	[celulosa(mg/mL)]	Absorbancia	Absorbancia de enzima	[glucosa(mg/mL)]	Vrxn (mg/mL*min)
3.5	0.5714	0.075	0	0.0522	0.0427
6.8	1.1102	0.173	0	0.0589	0.0481
10.2	1.6653	0.255	0	0.0645	0.0527
14.7	2.4000	0.405	0	0.0748	0.0611
17.4	2.8408	0.475	0	0.0796	0.0650
22	3.5918	0.57	0	0.0861	0.0703

La gráfica obtenida se muestra en la figura 7:

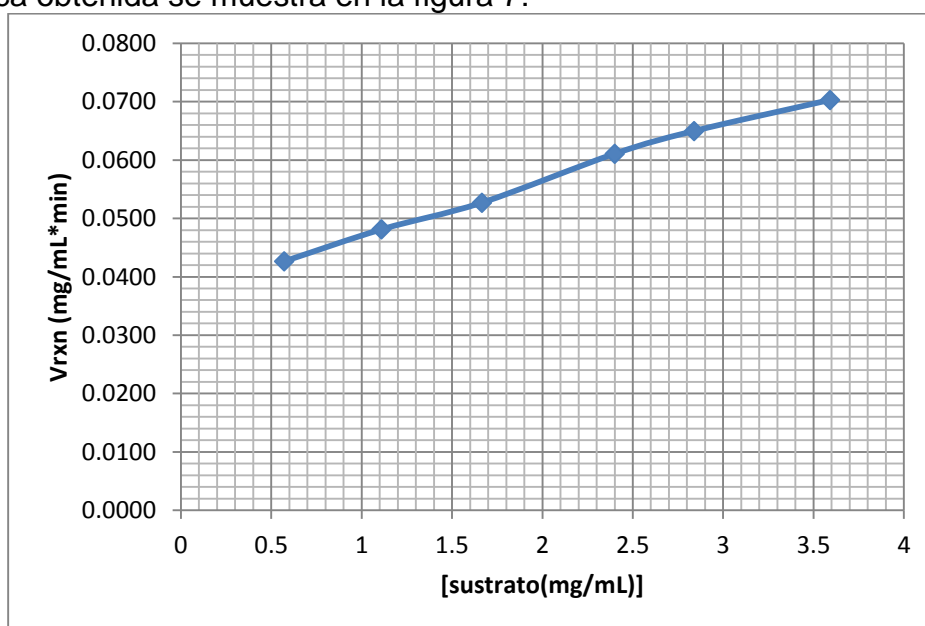


Figura 7. Respuesta de la celulasa frente a la concentración de sustrato.

9.1.3.1 Lineweaver-Burk para celulosa

Una vez obtenida la relación entre el aumento de concentración de sustrato y actividad catalítica (tabla 7), se procede a la linealización de los gráficos anteriores para obtener de estos los parámetros cinéticos.

Tabla 7. Inversos para la linealización

1/[celulosa](mL/mg)	1/Vrxn (mL*min/mg)
1.7500	23.4447
0.9007	20.7785
0.6005	18.9731
0.4167	16.3710
0.3520	15.3863
0.2784	14.2251

La gráfica obtenida se muestra en la figura 8:

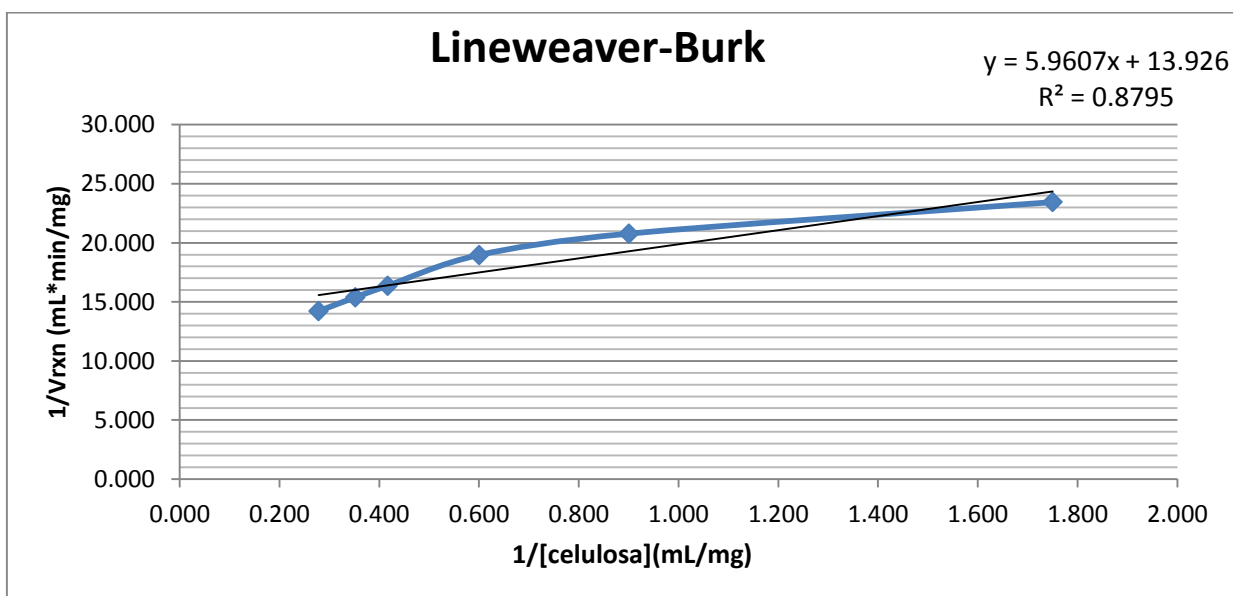


Figura 8. Curva de Lineweaver para celulase.

La gráfica representa la actividad de la enzima frente al cambio de la concentración de sustrato, donde se puede ver que la saturación de los sitios activos de la enzima se produce una vez que esta actúa a su velocidad máxima de catálisis. A partir de la figura 8 se determina la velocidad máxima de reacción de la enzima y la afinidad por su sustrato (K_m), dando como resultado $V_{m\acute{a}x} = 0.07181 \text{ mg / mL} \cdot \text{min}$ y $K_m = 0.42803 \text{ mg/mL}$

9.2 ACTIVIDAD PECTINASA

9.2.1 Efecto del pH

Estos resultado usando la metodología propuesta, con la diferencia que se varió el pH.

Tabla 8. Cálculos de la velocidad de reacción.

pH	[ácido galaturónico(mg/ml)]	Vrxn (mg/mL*min)
4	-0.012296272	-0.01250
5	0.14301499	0.14540
6	1.002233534	1.01894
7	1.271737986	1.29293
7.5	1.506089684	1.53119
8	1.541668533	1.56736
8.5	1.541455486	1.56715
9	1.37932672	1.40232

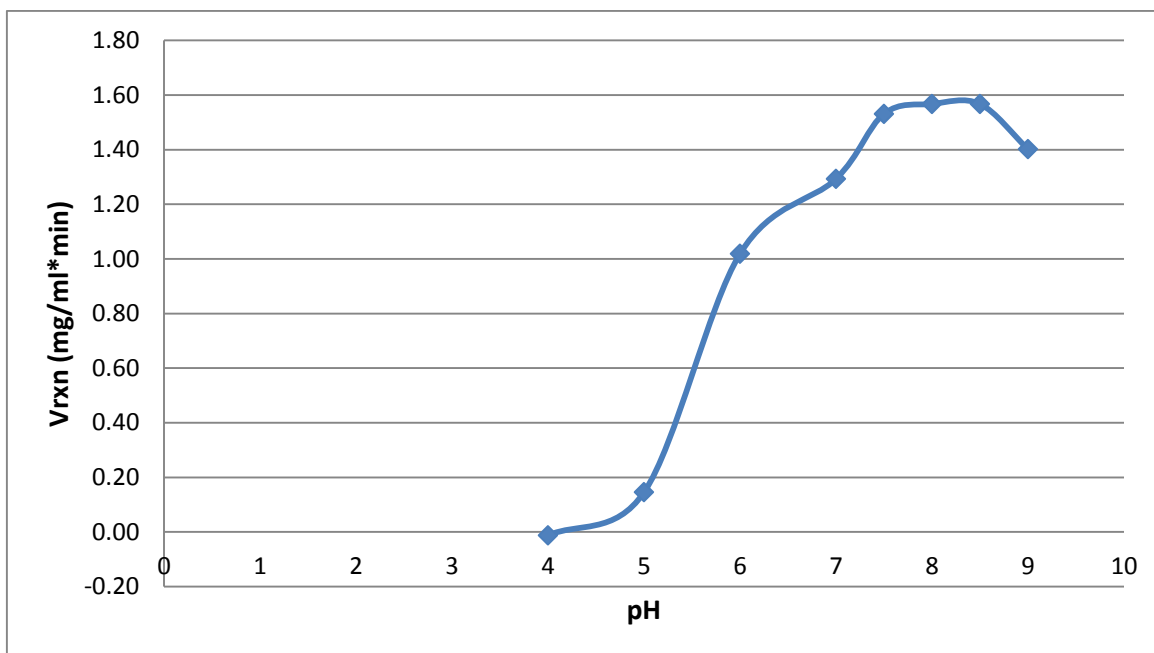


Figura 9. Gráfica del pH frente a la velocidad de reacción.

En la figura 9 se muestra que la actividad de la enzima se inhibe a pH 4 y la mayor actividad pectinasa se presenta en un intervalo pH 7.5-8.5, presentándose la mayor actividad a pH 8, aunque entre los pHs 7.5 y 8.5 la diferencia fue mínima del 2.3%. Esto nos indica que la enzima viscozime L tiene una mayor actividad pectinasa a pH neutro a ligeramente básico. Al comparar con la ficha técnica de Viscozime L, no coincide ya que nos indica un rango de pH 3.3-5.5, como rango de pH óptimo.

9.2.2 Efecto de la temperatura

Determinado el pH óptimo 8 se usó este para evaluar el efecto de la actividad a diferentes temperaturas. Obteniéndose los siguientes resultados (tabla 9):

Tabla 9. Cálculo de la velocidad de reacción

TEMPERATURA (°C)	[ác.galacturónico(mg/ml)]	Vrxn (mg/ml*min)
40	1.1477	1.1669
45	1.2647	1.2858
50	1.4283	1.452
55	1.2255	1.246
60	1.2191	1.239
65	1.2247	1.245
70	0.9569	0.973

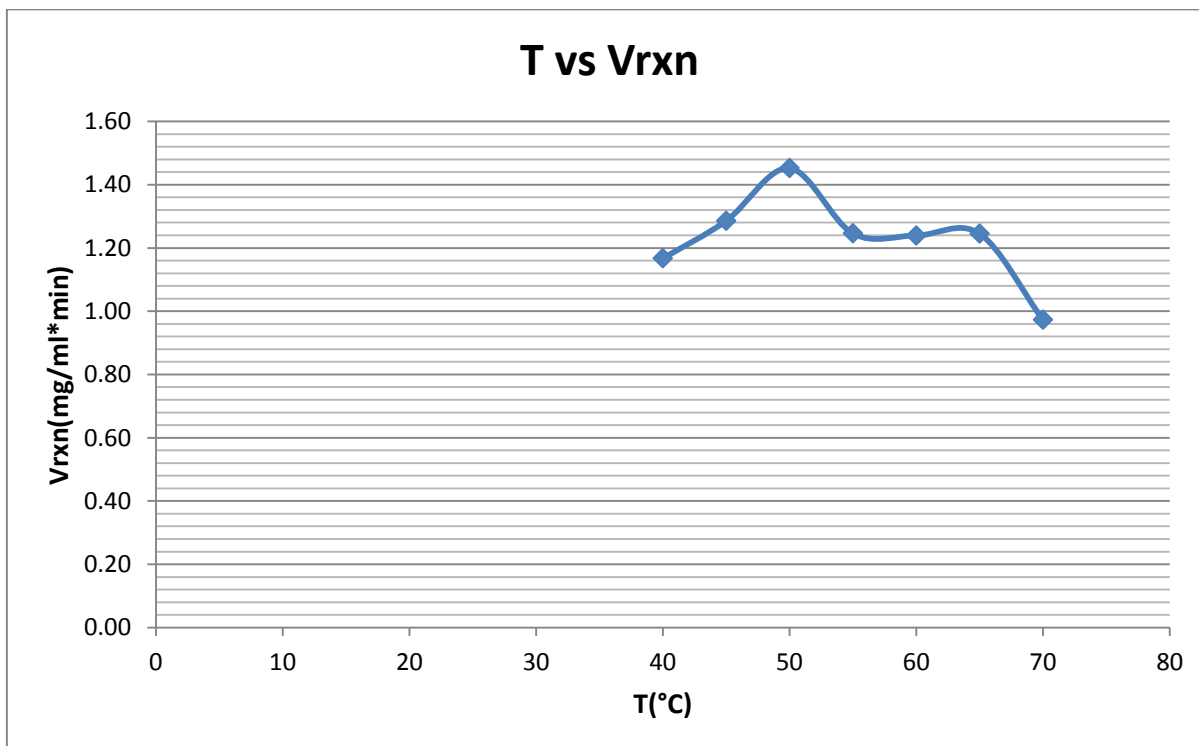


Figura 10. Respuesta de viscozyme L frente a la temperatura

En el gráfico de la figura 10 se observa que hubo una mayor actividad de la enzima a la temperatura de 50 °C, entre 55- 65 °C se estabiliza la actividad y a más de 70°C baja en un 37% su máxima actividad debido a que la enzima se desnaturaliza a partir de esta temperatura. Los resultados están dentro del rango óptimo (40-50°C) que se menciona en la ficha técnica de viscozyme L.

9.2.3 Efecto de la concentración de sustrato

La saturación del sitio activo de la enzima por el sustrato juega un factor importante en la cinética química, lo anterior se muestra en la figuras 11. Se evaluó usando el pH y temperatura de mayor actividad pectinasa. En este caso se varió la concentración de pectina.

Tabla 10. Cálculo de la velocidad de reacción.

[pectina(mg/mL)]	[ác. galacturónico(mg/mL)]	Vrxn (mg/mL*min)
0.2	2.1682	0.7589
0.4	2.2607	0.7912
0.6	2.2747	0.7961
0.8	2.2817	0.7986
1	2.2887	0.8011

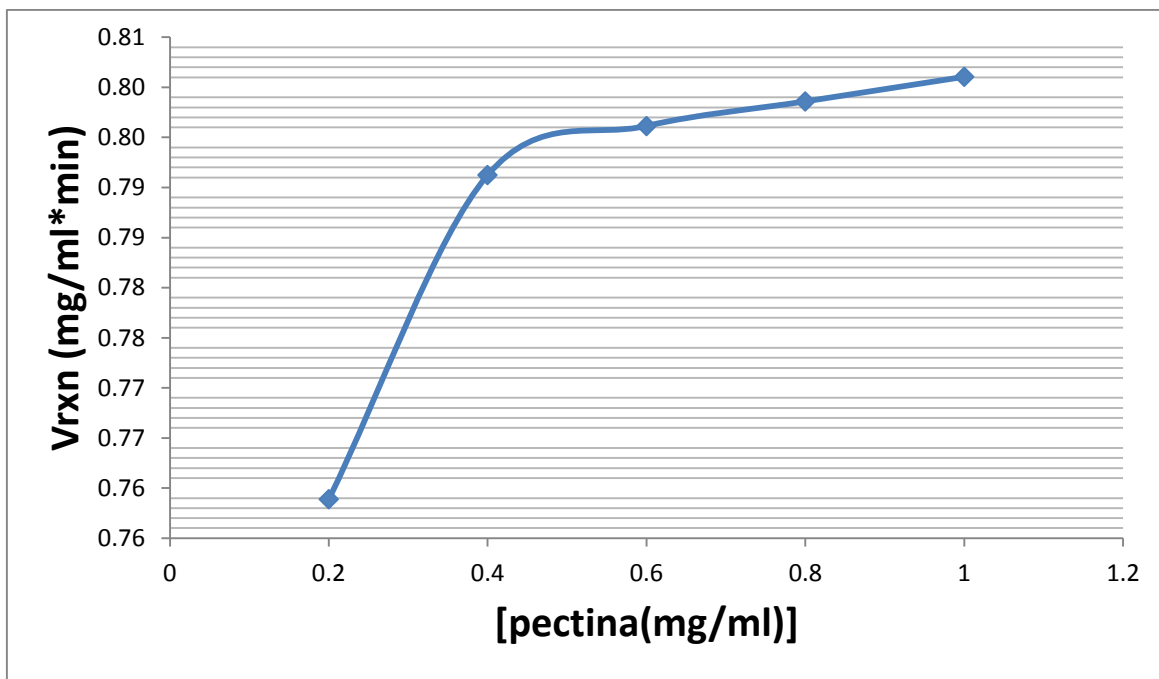


Figura 11. Gráfica del efecto de la concentración de sustrato frente a la actividad enzimática

Al evaluar el efecto de la concentración de pectina sobre la actividad de la enzima (figura 11) se observa que la actividad de la enzima crece conforme se incrementa la concentración de pectina y se hace máxima en 0.8 mg/mL*min.

9.2.3.1 Lineweaver-Burk para pectinasa

Una vez determinada la relación entre el aumento de concentración de sustrato y actividad catalítica, se procede a la linealización, calculando sus inversos, de el grafico de la figura 11 para obtener de este los parámetros cinéticos.

Tabla 11. Inversos para linealizar

1/[pectina](mL/mg)	1/Vrxn (mL*min/mg)
5.000	1.3177
2.500	1.2638
1.667	1.2561
1.250	1.2522
1.000	1.2484

La gráfica obtenida se muestra en la figura 12:

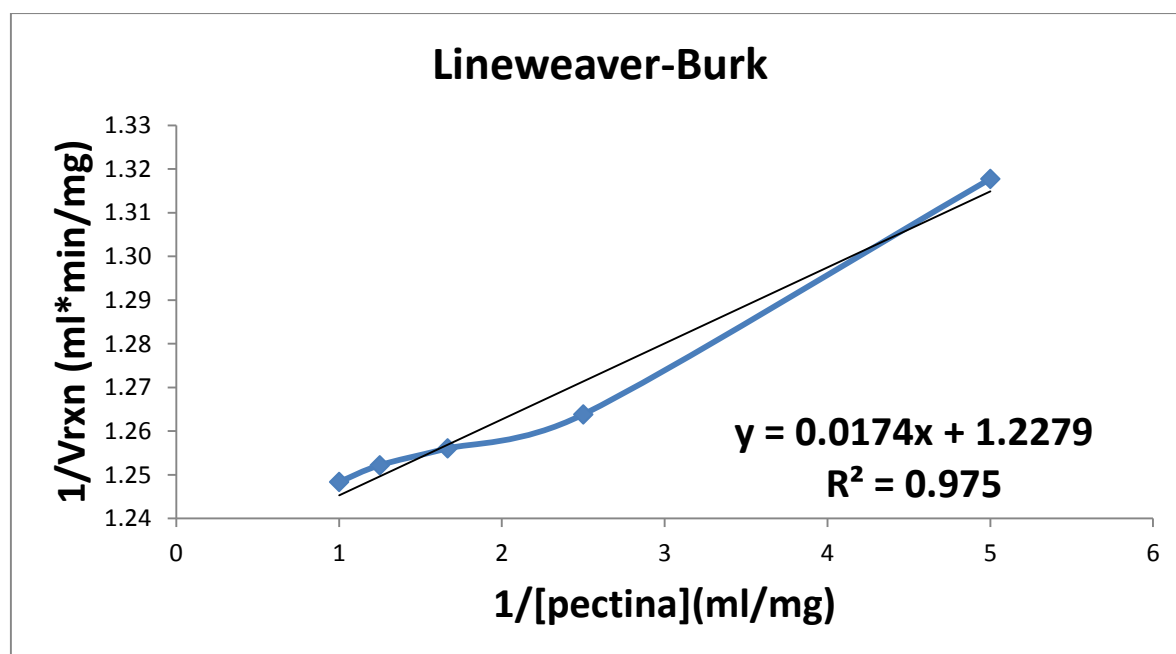


Figura 12. Gráfico de Lineweaver para la actividad pectinasa.

La figura 12 representa la actividad de la enzima frente al cambio de la concentración de sustrato, donde se puede ver que la saturación de los sitios activos de la enzima se produce una vez que actúa a su velocidad máxima de catálisis, así para la pectinasa la velocidad máxima es $0.8144 \text{ mg/mL}\cdot\text{min}$ y una afinidad por el sustrato de $K_m = 0.01417 \text{ mg/mL}$

10 CONCLUSIONES.

Con la realización de este trabajo se logró evaluar la actividad enzimática de dos enzimas comerciales Cellulase y Viscozyme L, actividad celulasa y pectinasa respectivamente. Con las metodologías basadas en curvas patrones de sus productos de las reacciones, se obtuvieron gráficas en las que se observó su comportamiento a diferentes pH, temperatura y concentraciones de sustrato, y como resultado las condiciones óptimas para catalizar las reacciones de celulasas y pectinasas. La dependencia del pH se debe a los cambios en los estados de ionización de los aminoácidos del sitio activo de la enzima (Lehninger 1987) . Los resultados obtenidos nos permitieron compararlos con las fichas técnicas de las enzimas comerciales, los cuales en el caso de la Cellulase el pH coincidió siendo el óptimo pH 5; el resultado de la temperatura óptima fue 60°C que está dentro del rango de temperatura que menciona la ficha técnica; la evaluación a diferentes concentraciones de celulosa, usando la ecuación de Lineweaver-Burk arrojó el resultado de $V_{m\acute{a}x}=0.07181 \text{ mg/mL}\cdot\text{min}$ y $k_m= 0.42803 \text{ mg/mL}$, que nos indican la velocidad máxima de la enzima y la afinidad de la enzima por su sustrato ya que k_m es baja.

A la enzima comercial Viscozyme L, se le evaluó la actividad pectinasa. El resultado de pH óptimo resultado de la evaluación fue de 8, que no coincide con el rango de pH 3.3-5.5 que indica la ficha técnica; la temperatura óptima fue según la evaluación de 50°C, que coincide con la información de la ficha técnica; la evaluación a diferentes concentraciones de pectina, usando la ecuación de Lineweaver-Burk arrojó el resultado de $V_{m\acute{a}x}=0.8144 \text{ mg/mL}\cdot\text{min}$ y $k_m= \text{mg/MI}$ que nos indican la velocidad máxima de la enzima y la afinidad de la enzima por su sustrato ya que k_m es muy baja.

Los datos obtenidos en las evaluaciones comparados con las fichas técnicas nos indican el estado de las enzimas comerciales y además de servirnos para otros experimentos de cuanto usar y cuáles son las condiciones que se le deben dar a la enzima para que trabajen a su máxima capacidad.

11 RECOMENDACIONES

Determinar las actividades de otras enzimas hidrolasas, que nos brinden información de sus condiciones óptimas y así poder registrarlo en una base de datos para futuros experimentos.

12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

s.f. www.Bio-cat.com.

Badui, Salvador. *Química de los alimentos*. México: Alhambra Mexicana, 1999. 281-289

Bustamante, Ernesto. *El sistema nervioso*. Medellín: Universidad de Antioquia, 2007. 16-19

Dornier, J. «Cirad (Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement).» *Montpellier France Cedex 01*, s.f.

Frettinger, A. *Caracterización Enzimática de la Pared Vegetal de Frutas Tropicales*. Luminum ediciones, 1997.

Gacesa. *"Tecnología de las Enzimas"*. Ed Acribia S.A, 1990.

García, Carlos. *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos*. España: Mundi empresa, 2003. 154-162

Ghose, t. K. «Measurement of cellulase activities.» *International union of pure and applied chemistry*, 1987: 257-268.

Grajales, Ofelia. *Apuntes de Bioquímica vegetal*. México: Universidad Autónoma de México, 2005. 46- 57

Lehninger, A. *Bioquímica*. España: 2a ed., 1987. 192-197

Marquina, D. «Producción de biomasa de hongos celulolíticos para la degradación de residuos celulósicos.» *Universidad complutense de Madrid*, 2005: 47.

Monsalve, J. «Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca.» *Dyna*, 2006: 21-27.

N, Halvor. *Cinética enzimática*. Barcelona: Reverté, 1980. 33-39

Paz, Jorge. *Propiedades Bioquímicas del suelo de Galicia*. Galicia: Facultad de farmacia, 1995. 35-44

13 ANEXOS

ANEXO 1

Curvas patrón

13.1 Curva patrón de azúcares reductores

Esta curva se realizó preparando una solución patrón de glucosa de [0.1 g/mL], adicionando 0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.45, 0.50 mL, de la solución patrón. Completando el volumen a 0.5 ml con agua destilada. Y posteriormente dándole tratamiento del método del DNS. Los resultados se encuentran en la tabla 4.

Tabla 12. Datos para la obtención de la curva patrón glucosa.

[Glucosa (mg/mL)]	Absorbancia (540nm)
0.0000	0.000
0.0083	0.048
0.0250	0.272
0.0417	0.612
0.0583	0.824
0.0750	1.077
0.0833	1.288

La gráfica obtenida se muestra en la figura 13:

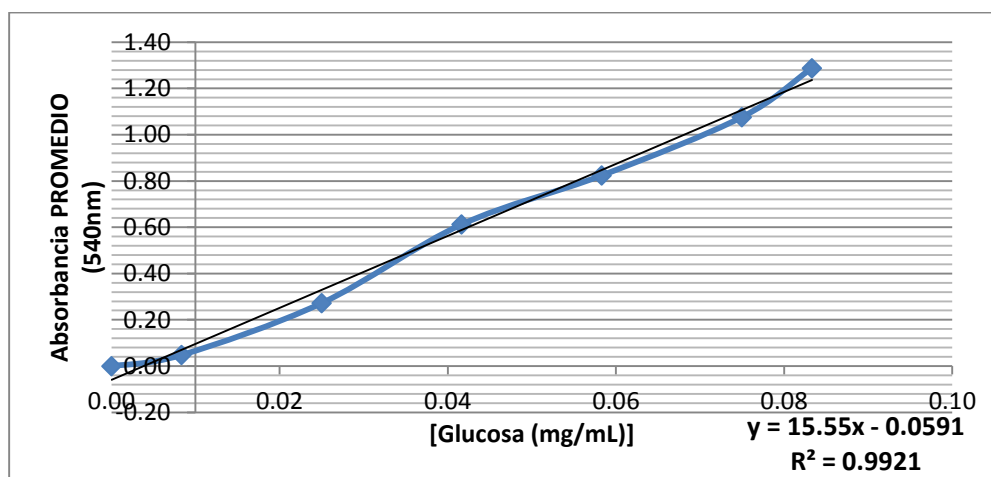


Figura 13. Curva patrón de glucosa

De la ecuación obtenida con la regresión lineal se llegó a esta:

$$\left[\text{glucosa} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \right] = \frac{\text{absorbancia}}{15.55} + 0.0591$$

Que nos permite calcular la concentración de glucosa, sustituyendo el valor de absorbancia.

13.1.1 Curva patrón de glucosa2.

Hubo la necesidad de hacer otra curva patrón de glucosa ya que la solución DNS se terminó. Las mediciones se muestran en la tabla 7:

Tabla 13. Datos para la obtención de la curva patrón glucosa.

[Glucosa (mg/ml)]	Absorbancia (540nm)
0.0000	0.0000
0.0083	0.0473
0.0250	0.2917
0.0417	0.5510
0.0583	0.8073
0.0750	1.0647
0.0833	1.1733

La gráfica obtenida se muestra en la figura 14:

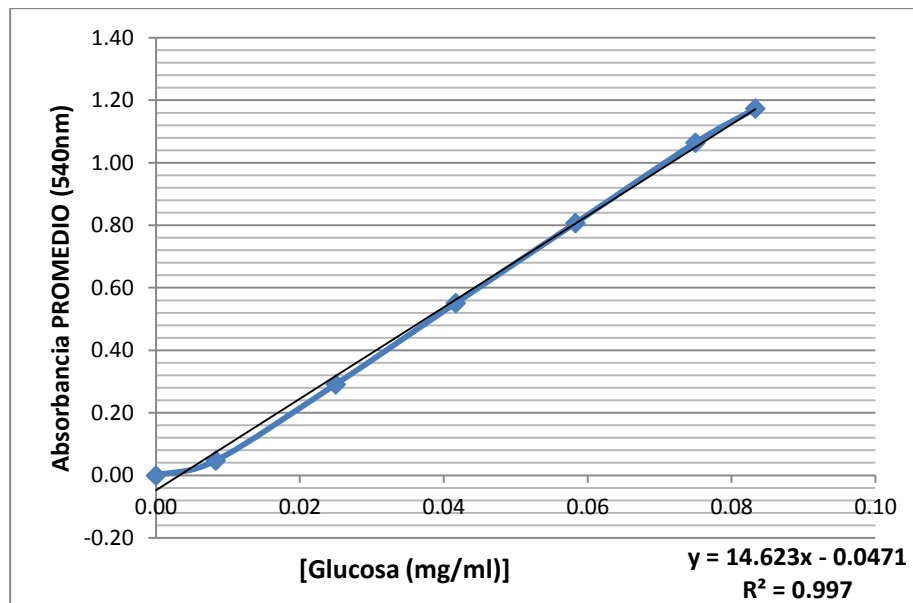


Figura 14. Curva patrón de glucosa 2.

De la ecuación obtenida de la regresión lineal se despejó a x que es la que representa la concentración de glucosa dando lo siguiente:

$$\left[\text{glucosa} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \right] = \frac{\text{absorbancia}}{14.623} + 0.0471$$

13.2 Curva patrón de ácido galacturónico

Esta curva se realizó con soluciones de ácido galacturónico a diferentes concentraciones de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL. Posteriormente dándole un tratamiento agregando 0.5ml de DNS, hirviendo 15min y enfriando en baño de hielo. Por último se registró la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 510nm.

Tabla 14. Datos para curva patrón de ácido galacturónico.

[ácido galacturónico (mg/mL)]	ABSORBANCIA PROMEDIO (510nm)
0	0.0000
0.2	0.2903
0.4	0.5687
0.6	0.8823
0.8	1.2487
1	1.5527

La gráfica obtenida se muestra en la figura 15:

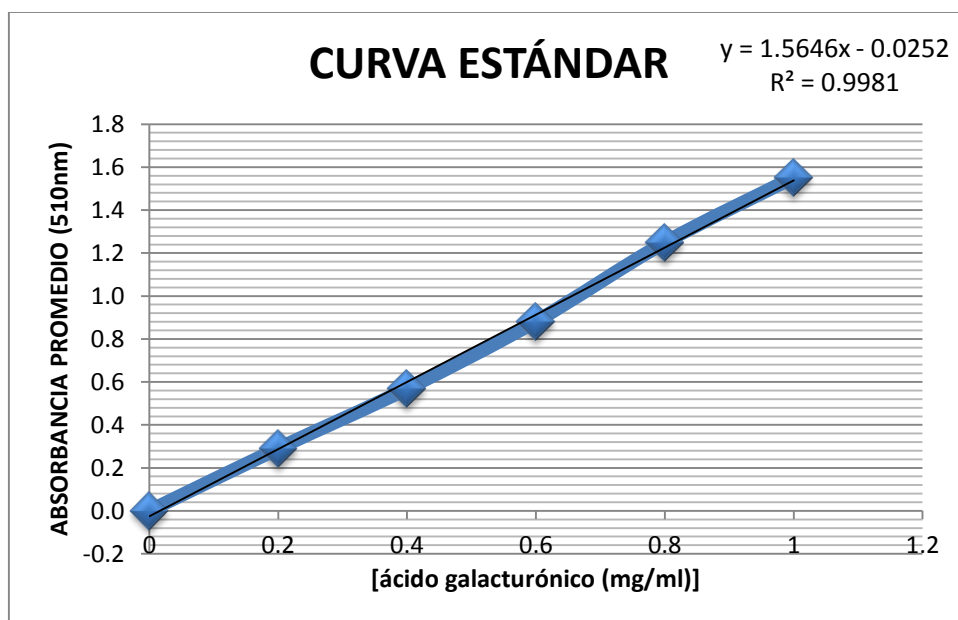


Figura 15. Curva patrón de ácido galacturónico

A partir de los datos de la tabla 10 se hizo una regresión lineal, la ecuación lineal obtenida se muestra en la figura 11, a partir de esta ecuación se despejó a x (concentración de ácido galacturónico), dando como resultado la siguiente ecuación:

$$\left[\text{ácido galacturónico} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \right] = \frac{\text{absorbancia}}{1.5646} + 0.0252$$

13.3 Curva estándar de ácido galacturónico 2

Se presentó la necesidad de hacer una nueva curva estándar.

Tabla 15. Datos para la curva patrón de ácido galacturónico.

[ácido galacturónico (mg/mL)]	ABSORBANCIA PROMEDIO (510nm)
0	0.0000
0.2	0.1973
0.4	0.4537
0.6	0.8463
0.8	1.1280
1	1.4243

La gráfica obtenida se muestra en la figura 16:

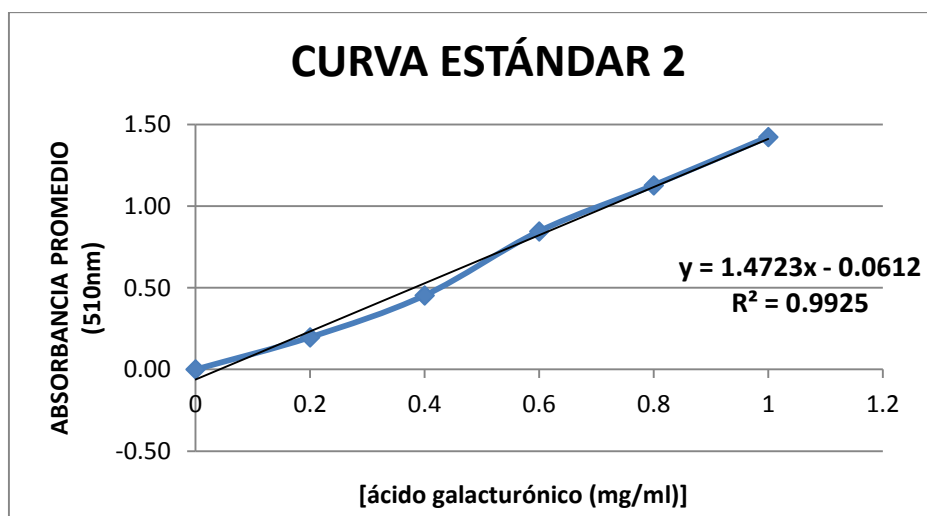


Figura 16. Curva patrón dos de ácido galacturónico.

Haciendo la regresión lineal con los datos de la tabla 13 se obtuvo la ecuación lineal que se muestra en la figura 16, dando un coeficiente de correlación muy cercano a uno, por lo tanto, confiable. Posteriormente se hizo el despeje de la ecuación lineal que sirve para calcular la concentración de ácido galacturónico obteniendo la siguiente ecuación:

$$\left[\text{ácido galacturónico} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \right] = \frac{\text{absorbancia}}{1.4723} + 0.0612$$

Tablas de resultados

Tabla 16. Datos para la curva patrón de glucosa

Tubo	Solución buffer (pH)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia media	[glucosa(mg/mL)]	Vrxn (mg/mL*min)
Blanco espectro	5	0	0	0	0.00000	0.0591	0.0483
Blanco Enzima	5	0.024	0.007	0.039	0.02333	0.0606	0.0495
1	2	0.177	0.236	0.151	0.18800	0.0712	0.0581
2	3	0.384	0.233	0.281	0.29933	0.0783	0.0640
3	4	0.383	0.345	0.345	0.35767	0.0821	0.0670
4	5	0.38	0.406	0.31	0.36533	0.0826	0.0675
5	6	0.399	0.313	0.351	0.35433	0.0819	0.0669
6	7	0.335	0.312	0.358	0.33500	0.0806	0.0659

Tubo	[Glucosa (mg/ml)]	Absorbancia 1 (540nm)	Absorbancia 2 (540nm)	Absorbancia 3 (540nm)	PROMEDIO	Desviación estandar
1(blanco)	0.0000	0	0	0	0.000	0
2	0.0083	0.048	0.009	0.086	0.048	0.038501082
3	0.0250	0.336	0.036	0.444	0.272	0.211395364
4	0.0417	0.589	0.435	0.813	0.612	0.190077177
5	0.0583	0.906	0.506	1.061	0.824	0.286370972
6	0.0750	1.094	0.818	1.318	1.077	0.250450261
7	0.0833	1.255	1.105	1.505	1.288	0.202072594

Tabla 17. Datos de cálculo de velocidad de reacción

Tabla 18. Datos para calcular velocidad de reacción

TEMPERATURA (°C)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia de enzima	Absorbancia media	[glucosa(mg/mL)]	Vrxn (mg/mL*min)
30	0.253	0.25	0.252	-0.008	0.260	0.075799	0.061902
35	0.279	0.264	0.257	0.01	0.263	0.076035	0.062095
40	0.324	0.303	0.312	0.01	0.310	0.079014	0.064528
45	0.41	0.386	0.413	0	0.403	0.085016	0.069430
50	0.421	0.416	0.43	0.011	0.419	0.086024	0.070253
60	0.492	0.476	0.453	0.01	0.470	0.089347	0.072966
70	0.44	0.43	0.435	0.008	0.432	0.086903	0.070971
80	0.356	0.297	0.396	0.016	0.344	0.081244	0.066349

Tabla 19. Datos para la curva patrón de glucosa dos

Tubo	[Glucosa (mg/mL)]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	PROMEDIO	Desviación estandar
1 (blanco)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.0083	0.0440	0.0530	0.0450	0.0473	0.0040
3	0.0250	0.2900	0.3140	0.2710	0.2917	0.0176
4	0.0417	0.5540	0.5520	0.5470	0.5510	0.0029
5	0.0583	0.8160	0.8030	0.8030	0.8073	0.0061
6	0.0750	1.1030	0.9920	1.0990	1.0647	0.0514
7	0.0833	1.2290	1.0920	1.1990	1.1733	0.0588

Tabla 20. Cálculo de velocidad de reacción

sutrato celulosa(mg)	[celulosa(mg/mL)]	Absorbancia	Absorbancia de enzima	[glucosa(mg/mL)]	Vrxn (mg/mL*min)
3.5	0.5714	0.075	0	0.0522	0.0427
6.8	1.1102	0.173	0	0.0589	0.0481
10.2	1.6653	0.255	0	0.0645	0.0527
14.7	2.4000	0.405	0	0.0748	0.0611
17.4	2.8408	0.475	0	0.0796	0.0650
22	3.5918	0.57	0	0.0861	0.0703

Tabla 21. Datos para curva patrón de ácido galacturónico

Tubo	[ácido galacturónico (mg/mL)]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	ABSORBANCIA PROMEDIO (510nm)	Desviación estandar
1T	0	0.000	0.000	0.000	0.0000	0.0000
2	0.2	0.237	0.384	0.250	0.2903	0.0814
3	0.4	0.590	0.578	0.538	0.5687	0.0272
4	0.6	0.917	0.899	0.831	0.8823	0.0454
5	0.8	1.245	1.250	1.251	1.2487	0.0032
6	1	1.478	1.578	1.602	1.5527	0.0658

Tabla 22. Cálculo de velocidad de reacción

Tubo	pH	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Absorbancia media	[ácido galaturónico(mg/mL)]	Vrxn (mg/mL*min)
Blanco espectro	5	0	0	0	0	0	0
Blanco Enzima	5	0.027	0.076	-0.001	0.0340	0.0000	0
3	4	-0.098	0.047	-0.023	-0.0587	-0.01230	-0.01250
4	5	0.319	0.225	0.111	0.1843	0.14301	0.14540
5	6	1.596	1.776	1.316	1.5287	1.00223	1.01894
6	7	1.856	1.944	2.153	1.9503	1.27174	1.29293
Blanco Enzima 2	5	-0.046	-0.046	-0.046	-0.046	0.0000	0
7	7.5	2.412	2.087	2.314	2.317	1.50609	1.53119
8	8	2.462	2.196	2.322	2.373	1.54167	1.56736
9	8.5	2.474	1.98	2.525	2.372	1.54146	1.56715
10	9	2.067	1.943	2.208	2.119	1.37933	1.40232

Tabla 23. Cálculo de la velocidad de reacción

TEMPERATURA (°C)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Absorbancia de enzima	Absorbancia media	[ác.galaturónico(mg/mL)]	Vrxn (mg/mL*min)
40	1.636	1.894	1.895	0.052	1.7563	1.1477	1.1669
45	2.143	1.89	2.058	0.091	1.9393	1.2647	1.2858
50	2.137	2.264	2.269	0.028	2.1953	1.4283	1.452
55	1.954	1.905	1.847	0.024	1.8780	1.2255	1.246
60	1.817	2.08	1.836	0.043	1.8680	1.2191	1.239
65	2.214	1.884	1.94	0.136	1.8767	1.2247	1.245
70	1.502	1.537	1.547	0.071	1.4577	0.9569	0.973

Tabla 24. Datos para la curva patrón de ácido galacturónico dos.

Tubo	[ácido galacturónico (mg/ml)]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	ABSORBANCIA PROMEDIO (510nm)	Desviación estandar
1T	0	0.000	0.000	0.000	0.0000	0.0000
2	0.2	0.116	0.190	0.286	0.1973	0.0852
3	0.4	0.426	0.438	0.497	0.4537	0.0380
4	0.6	0.775	0.777	0.987	0.8463	0.1218
5	0.8	1.122	1.122	1.140	1.1280	0.0104
6	1	1.482	1.410	1.381	1.4243	0.0520

Tabla 25. Cálculo de la velocidad de reacción

[pectina(mg/mL)]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Absorbancia de enzima	Absorbancia promedio	[ác. galacturónico(mg/mL)]	Vrxn (mg/mL*min)
0.2	3.186	2.936	3.065	0.055	3.0073	2.1682	0.7589
0.4	3.254	3.205	3.124	0.055	3.1393	2.2607	0.7912
0.6	3.207	3.262	3.174	0.055	3.1593	2.2747	0.7961
0.8	3.037	3.303	3.333	0.055	3.1693	2.2817	0.7986
1	3.03	3.277	3.396	0.055	3.1793	2.2887	0.8011