

31
205



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACCION DE
ENZIMAS AMILOLITICAS EN LA OBTENCION DE UN
HIDROLIZADO DE PAPA PARA LA PRODUCCION
DE ACIDO LACTICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
SARA MARIA CERDA SANCHEZ



1993

TESIS CON
FALLA LE ORGEN



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 está 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.

INDICE

CAPITULO	PAG
I.- Introducción	1
II.- Generalidades	3
III.- Material y Métodos	20
3.1.-Determinación del contenido de almidón y Carbohidratos totales en papa	21
3.2.-Hidrólisis Enzimática	22
3.3.-Fermentación Láctica	24
IV.- Resultados	27
V.- Discusión de Resultados	45
VI.- Conclusiones	49
VII.- Apéndice	52
7.1.-Métodos	53
7.2.-Enzimas Utilizadas	63
7.3.-Medios de Cultivo	65
VIII.-Bibliografía	68

I.- INTRODUCCION

INTRODUCCION

El uso de enzimas en procesos industriales tiene cada vez mas auge. Actualmente, estas se ofrecen comercialmente en formas altamente purificadas, y aunque sus costos son altos éstos se aminoran debido a que pequeñas cantidades de ellas son capaces de actuar sobre una gran cantidad de sustrato.

El motivo principal de este trabajo es comparar la acción de enzimas comerciales purificadas y enzimas no purificadas en la hidrólisis de almidón, con tal fin se llevó a cabo un estudio detallado en cuanto a la duración de los tiempos de hidrólisis y tiempo del proceso de fermentación, valorando las ventajas y desventajas de cada procedimiento para finalmente seleccionar el proceso mas redituable en la obtención de glucosa, a fin de utilizar este hidrolizado para la producción de Acido Láctico.

Como fuente de almidón se seleccionó a la papa de desecho ya que una gran cantidad de este tubérculo es desperdiciada anualmente y al ser usada en esta forma se obtiene una alternativa de aminorar costos en la producción de ácido Láctico, alcohol, y otros procesos cuya materia prima es la glucosa.

II.- GENERALIDADES

GENERALIDADES

La mayor parte de los glúcidos presentes en la naturaleza se encuentran como polisacáridos. Los polisacáridos también denominados glucanos difieren tanto en la naturaleza de sus unidades monosacáridas como en la longitud de sus cadenas y grado de ramificación. Estos se dividen en homopolisacáridos constituidos por un solo tipo de unidad monomérica y heteropolisacáridos con dos o más unidades monómeras diferentes. El almidón es un homopolisacárido constituido por unidades de D-glucosa. (17)

El almidón es el principal constituyente de muchos vegetales. Al microscopio se observa como gránulos diminutos circulares de tamaño y forma característica dependiendo de la fuente de procedencia. Dichos gránulos contienen dos polímeros de glucosa unidos mediante enlaces glucosídicos alfa. Estos son la amilosa y la amilopectina. La proporción de los dos polímeros varía de acuerdo al origen del almidón pero por lo general es de 15 a 30% de amilosa y de 70 a 85% de amilopectina. (17,18,28)

La estructura molecular de amilosa la constituye una cadena lineal flexible no ramificada de 500 ó más unidades de

glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos α -1,4 la cual es capaz de torcerse y enrollarse en espiral en un espacio tridimensional. En contraste, la estructura de la amilopectina además de poseer cadenas lineales similares a las de la amilosa cuenta con numerosas ramificaciones conectadas a las porciones lineales por enlaces α -1,6. Los pesos moleculares indican que hay hasta un millón de unidades de D-glucosa por molécula. La longitud media de las ramificaciones es de 24 a 30 residuos de glucosa según el tipo de almidón del que provengan. (C.19,28,40)

Una de las propiedades inherentes del almidón es su capacidad de gelificarse cuando una suspensión acuosa de éste es sometida a un tratamiento térmico con el cual la energía calorífica disocia las regiones más débilmente unidas dentro de los gránulos y estos empiezan a hincharse, la suspensión entonces se transforma en una pasta y la viscosidad se incrementa. En esta forma el almidón es susceptible al ataque químico, mecánico ó enzimático ya que en su estado nativo es resistente a estos agentes y tiene baja capacidad para combinarse con el agua. (17)

Dos de las enzimas responsables del ataque hidrolítico del almidón gelatinizado son la α -amilasa y la glucoamilasa. (C.17)

La α -amilasa (α -1,4-glucan-glucanohidrolasa E.C.3.2.1.1)

es una enzima de la clase de las hidrolasas, especializada en la hidrólisis de compuestos o-glicosil. Este tipo de enzimas se encuentran en plantas y en tejidos de mamíferos y algunos microorganismos tales como hongos del género Aspergillus y bacterias como Bacillus sp. (9)

En lo que se refiere a sus pesos moleculares éstos se encuentran en el rango de 40,000 a 60,000 incluyéndose las α -amilasas fúngicas y bacterianas, con ligeras variaciones como es el caso de la α -amilasa de Bacillus licheniformis cuyo peso molecular es de 62,000. (16,41)

Las α -amilasas constan de una estructura primaria que comprende una cadena polipeptídica en donde se localizan sus grupos funcionales y sitios activos. Esta secuencia aminoácida está bien definida y sus grupos funcionales y terminales son siempre los mismos en amilasas de la misma procedencia en tanto que varían en amilasas de diferente origen y con ello las propiedades de la enzima. (10,16,39,41)

Aunque la información acerca de los grupos funcionales es aún muy difusa, los estudios realizados indican que los grupos amino primarios son indispensables para su acción catalítica, así como los grupos tirosil. (4)

Los grupos sulfhidril y disulfuro no están presentes en todas las α -amilasas, sin embargo las enzimas que los contienen muestran su participación en la actividad

enzimática ya que mantienen la configuración activa para quelatizar con el átomo de Calcio que es esencial aunque no corresponda al sitio activo.(4,13,21)

Las α -amilasas no contienen residuos glúcidos a excepción de la α -amilasa de Aspergillus oryzae que muestra pequeñas cantidades de glúcidos los que no toman parte en su actividad enzimática y casi desaparecen al obtener la enzima en un medio sintético. (41)

Este tipo de enzimas presentan además una estructura secundaria y terciaria que las cataloga como proteínas globulares y que se presume deben ser extremadamente impermeables y plegadas aportando un agrupamiento de grupos ligantes distribuidos a lo largo de las cadenas polipeptídicas creando sitios quelantes específicos para el Calcio.(10,10)

De este modo las α -amilasas han sido clasificadas como metaloenzimas , teniendo como cofactor al Calcio. La completa eliminación del Calcio da por resultado una inactivación y pérdida de estabilidad a la desnaturalización con calor y con proteasas. El Calcio no participa directamente en la formación del complejo Enzima-Sustrato pero mantiene a la molécula en la configuración óptima para la máxima actividad y estabilidad por la formación de una estructura cerrada intramolecular metal-quelato. El Calcio desempeña una doble función, mantiene a la proteína en la

configuración apropiada para la actividad biológica y estabiliza la estructura secundaria y terciaria confiriendo a la molécula de amilasa su arquitectura compacta. Se ha comprobado que trazas de Calcio son suficientes para compensar incluso a las enzimas libres de Calcio. En conclusión, la acción estabilizante del Calcio no está localizada en el sitio activo, pero afecta la estructura completa de la molécula de amilasa. (G.10.17.41)

La especificidad de las α -amilasas es la de catalizar la hidrólisis de enlaces glucosídicos α -1,4 en polisacáridos y sus productos de degradación. Es una endoamilasa que actúa de diversas formas aunque su acción es descrita como al azar. (G.9)

Existen diversos métodos para la valoración de su actividad enzimática basándose en alguno de los fenómenos siguientes, especialmente los tres primeros:

- a).-Decremento de la viscosidad
- b).-Incremento de los grupos reductores
- c).-Cambio de las propiedades de teñido del yodo
- d).-Cambio en la rotación óptica

La actividad de amilasa está expresada como:

- a).-Poder licuefactor, b).-Poder sacarificador y c).-Poder dextrinizante, respectivamente.

Para determinar el poder licuefactor unicamente se mide la disminución de la viscosidad del sustrato. El poder

sacarificador se evalúa a través de la determinación colorimétrica de los grupos reductores. El poder dextrinizante es valorado por la medición de la degradación del sustrato (almidón soluble o dextrinas), usando una concentración que es suficientemente alta para saturar la enzima hasta que la cinética se aproxima al orden cero con respecto al sustrato

La desaparición del sustrato es estimada por la determinación de los cambios del valor azul en el complejo amilosa-yodo. (3,38,46)

El mecanismo de acción de las α -amilasas involucra la ruptura de los enlaces glucosídicos con retención de la configuración y es efectuada por un grupo carboxilo y la función imidazol de un residuo de histidina. (10,17)

La cinética de las reacciones α -amilolíticas son mas complicadas que las descritas por la ecuación de Michaelis-Menten por la forma de ataque al sustrato. Además los productos de degradación del ataque inicial sirven como sustrato para que la enzima los reduzca al nivel de maltosa y maltotriosa. La velocidad con la cual las α -amilasas hidrolizan glucanos de diferentes grados de polimerización decrece rapidamente con la disminución del grado de polimerización. Además la amilosa es mas rapidamente hidrolizada que las moléculas ramificadas de amilopectina y de glucógeno. Los índices cinéticos básicos de K_m y V_{max} para los diferentes sustratos varían haciendo difícil la

interpretación de la cinética de la reacción. (10)

Usando sustratos de bajo peso molecular para dilucidar su mecanismo catalítico resulta en un conocimiento incompleto de la interacción Enzima-Sustrato, además si los grupos terminales reductores y no reductores de los polisacáridos tienen una influencia negativa en la susceptibilidad del sustrato a la hidrólisis, su proximidad y acción íntima en las moléculas de cadena corta puede afectar considerablemente toda la reacción. (1,17)

La reacción amilolítica es de por sí complicada debido a la naturaleza polimérica del sustrato, la ruptura de cada enlace glucosídico origina productos nuevos los cuales actúan a su vez como sustratos para la misma molécula de enzima. En el específico ataque al azar de las α -amilasas sus productos varían considerablemente en peso molecular, por lo que la enzima actuará en una serie de sustratos para los cuales muestre afinidades diferentes. (10,17,41)

A pesar de todos estos problemas, se ha demostrado que se pueden obtener velocidades iniciales comparables y precisas cuando la velocidad inicial (V_0) es expresada en términos de tiempo de reacción (t) necesario para la hidrólisis de una pequeña fracción de enlaces (F) donde a_0 es la concentración inicial del sustrato. (44)

$$V_0 = \frac{F \times a_0}{t}$$

Los valores obtenidos entre los 20° y los 30° para la constante de Michaelis-Menten de diversas amilasas aplicadas a una variedad de almidones ó componentes de éstos, muestran similitud alcanzando valores de 1 a 5×10^{-8} moles de enlaces glucosídicos por litro. La Km presenta valores más altos para las β -dextrinas y glicógeno y mucho más altos para los sustratos sintéticos como α -fenil maltósido. Las Δ de activación recorren desde 10 a 16 Kcal/mol. (13,37,44)

Se ha propuesto que en la reacción, el sustrato es orientado primero en la superficie de la enzima. Después de la protonación del puente de oxígeno para formar un ión oxonio, el enlace glucosídico es roto en el lado del C-1 dejando un ión carbonio intermediario. Durante la solvólisis la cual completa esta reacción SN₁, las restricciones estéricas impuestas por la superficie de la enzima en el residuo potencial reductor determina la conformación del anillo y finalmente la configuración del grupo reductor. Si por el contrario se asume un mecanismo de doble desplazamiento para la reacción de α -amilasa, esta procedería sin un cambio en la configuración óptica del átomo de Carbono anomérico. (23)

La influencia del pH y la temperatura sobre las enzimas es de considerable importancia.

Las curvas obtenidas al graficar actividad contra pH son

típicamente en forma de campana. La mayoría de las α -amilasas muestran actividades máximas en la región ácida a pHs entre 4.5 y 7 pero las formas de sus curvas y localización de sus pHs óptimos difieren dependiendo de la fuente de la enzima. Sin embargo se ha encontrado que existen α -amilasas alcalinas, en concreto la α -amilasa de Bacillus licheniformis exhibe una actividad óptima en el amplio rango de pH de 5.5 a 10. (10,27,41)

En cuanto a la temperatura las α -amilasas con un complemento total de Calcio son menos lábiles al calor y su estabilidad hacia él varía dependiendo de su origen. Las α -amilasas de Bacillus subtilis y Bacillus stearothermophilus eran hasta hace algunos años dos de las enzimas mas termoeestables en particular la última, la cual posee un rango de temperatura óptima de 55 a 70°C.

Por lo general su actividad se incrementa constantemente desde 0° hasta un máximo de 40°C aunque como se citó anteriormente existen algunas amilasas que resisten temperaturas de 70°C. No obstante, en estudios recientes se ha demostrado que existe una α -amilasa mas resistente al calor que el resto de amilasas y ésta es la α -amilasa de Bacillus licheniformis la cual es capaz de resistir temperaturas de hasta 100°C conservando hasta el 90% de su actividad máxima. (2,10,27,41)

Este tipo de enzimas termoeestables tienen aplicaciones

comerciales variadas como por ejemplo en industrias textiles y del papel, licuefacción del almidón, alimentos adhesivos y producción de azúcar. (2,8,10,17)

Otra de las enzimas involucradas en la hidrólisis del almidón es la glucoamilasa, conocida también como amiloglucosidasa, γ -amilasa ó glucamilasa, cuyo nombre sistemático es 1,4- α D-glucán glucohidrolasa E.C.3.2.1.3 y que al igual que la α -amilasa pertenece a la clase de las hidrolasas aptas para hidrolizar compuestos o-glicosil. (9)

La glucoamilasa es una enzima industrial importante usada para hidrolizar almidón y dextrinas a glucosa. Las preparaciones comerciales de esta enzima se derivan principalmente de diversas especies fúngicas de los grupos Aspergillus y Rhizopus.

Su purificación se lleva a cabo por métodos cromatográficos o por retención a un pH bajo de 2.8 para destruir a la α -amilasa, sin embargo aún las glucoamilasas altamente purificadas originan trazas de otros productos diferentes a la glucosa, en particular isomaltosa. Esto es debido a una propiedad de la glucoamilasa denominada reversión y que se dá en soluciones concentradas de D-glucosa, en donde por acción de esta enzima ocurren reacciones de condensación de la glucosa. (10,17,24,25)

Además si la glucoamilasa no está libre de D-glucosil transferasa, ésta también formará los productos de reversión.
(15,33,35)

En consecuencia para usos industriales de esta enzima se debe tener un control cuidadoso del alcance de esta reversión.(8)

En relación a la estructura de 3 isoenzimas de glucoamilasa provenientes de una mutante de Aspergillus niger se encontró que éstas presentaban una cadena polipeptídica única y que además estaban constituidas por una parte glúcida.
(7)

Sin embargo, en otros estudios realizados en cepas de Aspergillus niger no mutadas se encontró que solo existen dos isoenzimas de glucoamilasa, Glucoamilasa I y Glucoamilasa II.
(24,26)

Se determinó que el peso molecular de glucoamilasa oscila entre 97,000 y 100,000, encontrándose además que contiene residuos glúcidos de D-manosa, D-glucosa y D-galactosa como unidades estructurales integrales de la molécula enzimática. La función de estos residuos es estabilizar la estructura integral de la molécula.(33,36)

Existen diversos métodos de valoración para

glucoamilasa, uno de ellos es el microprocedimiento que sigue la actividad enzimática durante la síntesis y la purificación de esta enzima. Para ello, en la mezcla de reacción se utiliza un cromógeno (o-dianisidina), y la absorción UV del cromógeno reducido es monitoreada continuamente con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 440nm. (33)

Otro de los métodos es aquel que usa un pequeño número de valoraciones que involucran la determinación de la glucosa producida de almidón bajo condiciones estandarizadas. La determinación se hace cuantitativamente por medición de la cantidad de azúcares reductores de acuerdo a cantidades equimoleculares de amilasas, amilopectinas ó almidón de cadenas de diferentes longitudes. (35)

El siguiente procedimiento es un método de biovaloración basado en la medición de halos de hidrólisis por el desarrollo de microorganismos en un medio de agar almidón y es particularmente útil para valorar un gran número de muestras. Los diámetros de los halos de hidrólisis son una medida de la actividad enzimática en las muestras. (35)

Los resultados obtenidos en la transformación del almidón, la amilopectina y la amilosa, determinados por los métodos de Shaffer y Somogyi fueron de 96% en el almidón, 93% en la amilosa y 98% en la amilopectina lo que indica una conversión prácticamente completa. (35)

La glucoamilasa es una exoenzima que remueve unidades de glucosa desde el extremo no reductor de los polímeros de almidón. El enlace C(1)-O es roto por la acción de la glucoamilasa acompañándose por un mecanismo multicadena en el enlace α -D glucosídico del extremo no reductor con inversión de la configuración del grupo hidroxilo nuevamente generado unido al C(1), obteniéndose siempre como producto final β -glucosa. (45)

El ataque se efectúa en una proporción más rápida si la unidad terminal está unida por un enlace α -D(1-4) en lugar de un enlace α -D(1-6) para liberarlo de la molécula de oligosacárido. (24,34,35)

La unidad estructural mínima necesaria en un sustrato para la actividad de la amiloglucosidasa es una unidad glucosil unida a través de un enlace α -D(1-4) ó α -D(1-6) a una porción de glucosa la cual puede estar libre o sustituida en en la posición 1. (18,34,43)

Aún las dextrinas límite después de una hidrólisis intensa de almidón por esta enzima incrementan su rendimiento de glucosa y decrecen su porcentaje de dextrinas residuales, por esta razón han sido denominadas también como dextrinasas límite o maltasas. (15)

Se ha encontrado que hay cierta similitud entre la glucoamilasa y la β -amilasa, sin embargo, puesto que las dextrinas Schardinger no son inhibitorias a la acción de la glucoamilasa y su eficiencia es menor que la de la β -amilasa se considera que ésta puede ser la diferencia básica en el modo de acción de estas enzimas. (17)

Este tipo de enzimas solo actúan en almidón gelatinizado excepto para la glucoamilasa de Aspergillus awamori que es activa también en almidón crudo. (17)

Las proporciones de hidrólisis de enlaces α -1,4 reductores depende del tamaño y estructura molecular del sustrato incrementándose con el aumento del peso molecular del sustrato y por encima de la maltopentosa. (15,18,35,36)

Se han encontrado cuatro grupos carboxilo en el sitio activo así como también la presencia de un grupo imidazol. Estos grupos carboxilo están disociados y sus formas activas a pH 4.5 (el pH óptimo de la glucoamilasa) son COO^- y COOH respectivamente. Se sugiere que el sustrato unido incrementa la habilidad del primer grupo carboxilo para disociarse pero no cambia la conducta del segundo grupo carboxilo. (26)

Aunque la glucoamilasa es capaz de romper enlaces α -1,6 glucosídicos en moléculas ramificadas, no lleva a cabo una completa degradación a menos que sea durante periodos

prolongados de hidrólisis y utilizando la enzima altamente purificada. No obstante, se ha comprobado que en presencia de α -amilasa purificada, la acción sinérgica de ambas enzimas es capaz de producir una completa degradación en mucho menor tiempo. En el estadio primario de la reacción, las moléculas de almidón son escindidas por la acción de la α -amilasa, lo que facilita la acción de la glucoamilasa. Esto sucede hasta que el peso molecular del sustrato decrece a un cierto nivel a partir del cual la cinética solo será expresada por la proporción de la reacción de la glucoamilasa. (11)

En experimentos recientes se ha logrado modificar químicamente a la glucoamilasa por introducción de grupos amino adicionales y por acoplamiento a dextrana soluble por alquilación reductiva, con el objeto de darle rigidez a la conformación de la proteína, teniendo esto como finalidad la termoestabilización de la enzima. Sin embargo, esto se ha logrado solo en parte, debido a que esta enzima modificada es capaz de resistir temperaturas mas altas en comparación con la enzima no modificada, pero su nivel de termoestabilidad no es tan alto como aquél observado para otras enzimas, además, el impedimento estérico en el sitio activo resulta del acoplamiento covalente a dextrana y la pérdida de actividad debida a la conjugación, es proporcional al tamaño del sustrato. Por lo tanto, la glucoamilasa resulta ser una enzima muy difícil de termoestabilizar. (20)

Una de las razones de que la glucoamilasa no sea usada en forma inmovilizada, es porque hay un decremento en el rendimiento de glucosa, con respecto al encontrado cuando se utiliza la forma soluble de la enzima. Esto se debe a la baja difusión del producto a través de las partículas de glucoamilasa que están inmovilizadas, provocando que la glucosa acumulada acelere la formación de los productos de reversión. (24)

III.- MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

Como sustrato se empleó papa de tres tipos:

Papa alfa

Papa chica

Papa criolla

Se utilizaron dos enzimas comerciales que corresponden a Takatherm y Diazime L-200 proporcionadas por ENMEK (su origen y características se describen en el apéndice 7.2)

En la Fermentación del hidrolizado de papa se empleó el microorganismo Lactobacillus delbrueckii cepa ATCC 6640.

3.1.- Determinación del contenido de almidón y carbohidratos totales en papa.

3.1.1.-Contenido de almidón.- El primer punto en el trabajo experimental fué la realización de la curva patrón de almidón con la cual fué posible cuantificar el contenido de almidón de diversas variedades de papas.

3.1.2. -Determinación de Carbohidratos totales (12,30,32)

Se hizo en el macerado de papa, por medio del método de Antrona y con el objeto de tener como referencia la cantidad de carbohidratos de que se partía al inicio de la hidrólisis.

3.2. -Hidrólisis Enzimática

3.2.1. -Preparación de la muestra y gelatinización del almidón (8)

Se colocaron 40 g de papa en 100ml de agua destilada. Se licuaron durante 2 minutos, se tomó la muestra para la determinación de carbohidratos totales. Se transfirieron los 100 ml del macerado a matraces erlenmeyer de 300 ml se agregó Cloruro de calcio (0.04g) y se ajustó el pH a 6.5. Se gelatinizó el almidón por medio de calentamiento de los matraces en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos.

3.2.2. -Primera fase de la Hidrólisis con α -amilasa. (8)

Transcurridos los 20 minutos, tiempo en el que el almidón estuvo completamente gelatinizado se agregaron 0.072ml de α -amilasa (Takatherm), cantidad necesaria para hidrolizar el almidón contenido en 40g de papa.

La enzima se dejó actuar durante tres horas a temperatura de ebullición en el mismo baño de agua, rotando ligeramente los matraces a intervalos regulares de 15 a 30 minutos con el

fin de homogenizar y favorecer el contacto entre enzima y sustrato.

3.2.3.-Segunda fase de la Hidrólisis con Glucoamilasa (8)

Transcurridas las tres horas se sacaron los matraces del baño de agua, se ajustó el pH a 4.2 y se dejó enfriar el contenido de los matraces hasta conseguir una temperatura de 60°C. Una vez alcanzada esta temperatura se les adicionó 0.001 ml de la enzima glucoamilasa (Diazime L-200), colocando nuevamente los matraces en un baño de agua a temperatura constante de 60°C y en donde se mantuvieron hasta el término de la hidrólisis durante la cual se procuró rotar ligeramente los matraces a intervalos regulares de tiempo, para que la enzima tuviera la mayor superficie de contacto con el sustrato disponible.

Para llevar a cabo un control de la hidrólisis y determinar el término de la misma se cuantificaron azúcares reductores por el método de Nelson Somogyi. (5,22,29)

Los parámetros de concentración de sustrato, concentración de enzima, acción conjunta, pH óptimo y temperatura óptima, para la hidrólisis, fueron los establecidos en la literatura proporcionada por ENMEX. (8)

También se tomó en cuenta la recomendación acerca del empleo de las dos enzimas en forma conjunta para que se llevara a cabo una completa degradación del sustrato.

Para establecer el tiempo de hidrólisis los experimentos antes descritos se evaluaron para la α -amilasa a las 2 y 3

horas y para la glucoamilasa a las 96 y 72 horas; de aquí se tomaron los tiempos más convenientes para ambas enzimas.

3.3.-Fermentación Láctica.

Se utilizó la cepa Lactobacillus delbrueckii ATCC 9649 conservada en medio MRS (de Man, Rogosa and Sharpe). (14)

3.3.1.-Verificación de pureza y características metabólicas.

Con objeto de comprobar la pureza de la cepa así como sus características metabólicas, se realizaron observaciones microscópicas para establecer su morfología y reacción a la tinción de Gram y se procedió a efectuar pruebas bioquímicas de Fermentación de carbohidratos para lo que se utilizó caldo MRS como medio de cultivo basal pero con algunas modificaciones que corresponden a 0.2% de extracto de carne en vez de 1% y la incorporación de 0.05% (p/v) de rojo de clorofenol como indicador. Los carbohidratos problema fueron esterilizados por filtración en equipo Millipore y fueron adicionados al medio basal previamente esterilizado en una concentración final de 1%.

Se utilizaron 15 Azúcares que fueron los siguientes: Arabinosa, Fructosa, Galactosa, Glucosa, Lactosa, Maltosa, Manitol, Manosa, Melezitosa, Melobiosa, Rafinosa, Ramnosa, Sorbitol, Sacarosa, Xilosa. Los tubos fueron incubados a la temperatura óptima de desarrollo de L. delbrueckii y los

resultados fueron anotados diariamente por un período de 7 días.

3.3.2.-Establecimiento de la fase log en el desarrollo de Lactobacillus delbrueckii. (12,32)

Para determinar la curva de crecimiento de Lactobacillus delbrueckii se procedió de la siguiente forma: del cultivo stock se transfirieron dos asadas a tubos con tapón de rosca que contenían medio de cultivo MRS, los que se incubaron a 45°C durante 24 horas. De los cultivos activos se transfirieron 3 ml (inóculo 30) a matraces nefelométricos conteniendo 100 ml del mismo medio con un pH de 6.3. Los matraces se incubaron a una temperatura de 45°.

Las lecturas de crecimiento fueron tomadas cada tres horas en el Nefelómetro Klett equipado con filtro verde. Como testigo se utilizó el medio MRS sin inocular e incubado en las mismas condiciones. Esta determinación continuó haciéndose hasta obtener un número constante de unidades Klett que nos indicara el momento en que se alcanzó la fase estacionaria.

3.3.3.- Preparación del inóculo.

Una vez determinado mediante la curva de crecimiento el tiempo requerido para que el microorganismo se encontrara al final de la fase log de su desarrollo que es cuando se empieza a producir el Acido Láctico, se procedió a preparar el inóculo para la fermentación, para lo que la cepa se sembró nuevamente en tubos con tapón de rosca que contenían el medio

de cultivo MRS, se incubaron por 24 horas y de este cultivo se transfirieron aproximadamente 6.5ml a un matr az nefelom etrico que contenía 100ml del medio # 3, el que se incubó a 45 C durante aproximadamente 48 horas hasta obtener alrededor de 230 unidades Klett que corresponden a la población deseada de bacterias lácticas.

3.3.4. -Fermentación .

Para este propósito se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 ml adaptados para mantener condiciones de microaerofilia, conteniendo 100 ml del medio de Fermentación Láctica (Ver apéndice 7.3.5)

Las parámetros empleados en el desarrollo de las fermentaciones lácticas fueron los que se dan a continuación: pH inicial 6.0, inóculo 5%, Temperatura de incubación 42-45 C, tiempo del proceso 7 días (168 horas). (32)

Para ajustar el pH de la fermentación se us  CaCO₃ estéril hasta que éste ascendió nuevamente lo cual se realizó a los 3 , 5 y 6 días de la fermentación, el pH final fue de 4.6.

Al término de cada fermentación se cuantificó el Acido Láctico por el método de Nanni Baldini. (12,31,32)

IV RESULTADOS

RESULTADOS

En todas las tablas se muestran los resultados de determinaciones hechas por triplicado.

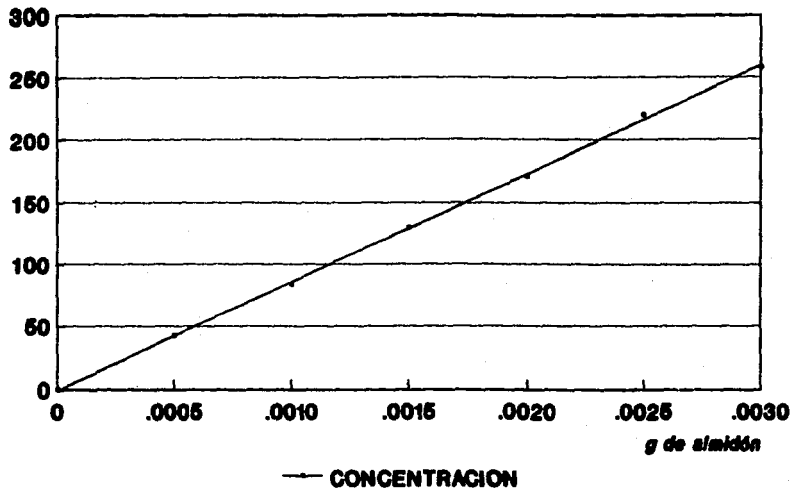
Tabla 1.

Resultados de la curva patrón de almidón.

Matraz	Lectura en U.K.	g de almidón
1	-	-
2	42	0.0005
3	84	0.0010
4	130	0.0015
5	171	0.0020
6	220	0.0025
7	258	0.0030

CURVA PATRON 'ALMIDON

U.K.



GRAFICA 1

Tabla 2

Contenido de almidón en diversas variedades de papa.

Tipo de papa	g de almidón/g de papa
Alfa	0.1734
Criolla	0.1584
Chica	0.1675

Tabla 3

Carbohidratos totales en 40 g de papa sin hidrolizar, determinados por el método de Antrona.

Experimento	Carbohidratos totales g/100ml
1	7.20
2	7.68
3	6.72
4	6.98

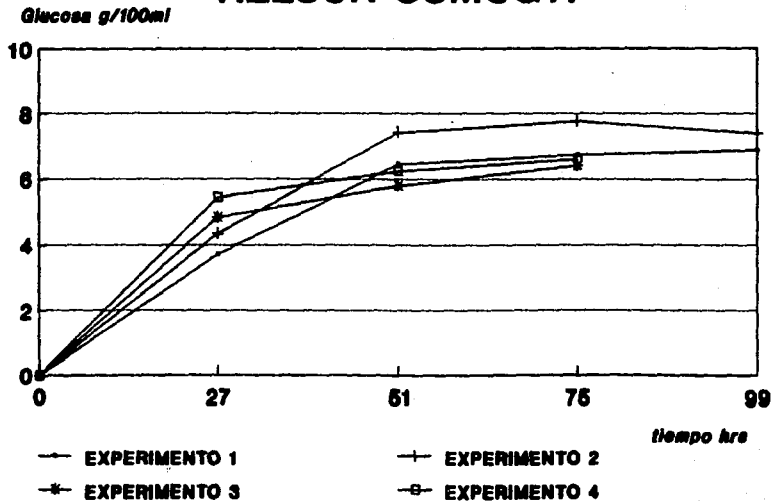
Tabla 4

Cuantificación de glucosa por el método de Nelson Somogyi durante el desarrollo de las diferentes hidrólisis con enzimas purificadas.

Tiempo de Hidrólisis (Horas)	EXPERIMENTOS			
	1	2	3	4
	g de Glucosa/100ml			
27	3.718	4.35	4.88	5.459
51	6.455	7.43	5.81	6.242
75	6.736	7.78	6.40	6.605
99	6.876	7.40		

Con base en los resultados obtenidos en los experimentos 1 y 2 se consideró como tiempo óptimo de Hidrólisis 75 horas, el que se aplicó en los siguientes experimentos.

GLUCOSA NELSON SOMOGYI



GRAFICA 2

Tabla 5.

Resultados de las Pruebas Bioquímicas de Fermentación de Carbohidratos por Lactobacillus delbrueckii cepa ATCC 9649

Azúcar	Patrón de Fermentación	Reacción Producida por la cepa en estudio
Arabinosa	-	-
Fructosa	+	+
Galactosa	-	-
Glucosa	+	+
Lactosa	-	-
Maltosa	d	-
Manitol	-	-
Manosa	+	+
Melezitosa	-	-
Melobiosa	-	-
Rafinosa	-	-
Ramnosa	-	-
Sorbitol	-	-
Sacarosa	+	+
Xilosa	-	-

Las pruebas se hicieron con un testigo de cada azúcar probado sin inocular. Los resultados fueron observados diariamente durante siete días.

d=dudosa

Tabla 6.

**Resultados del desarrollo de Lactobacillus delbrueckii
cepa ATCC 9649 a diferentes periodos de incubación.**

Tiempo (horas)	Lectura (UK)
0	10
3	23
6	24
9	26
15	89
18	137
21	176
24	226
27	230
30	240
33	240
39	244
42	250
45	250
48	248
51	250
54	250

CURVA DE CRECIMIENTO

Lactobacillus delbrueckii CEPA ATCC 9649

U.K.

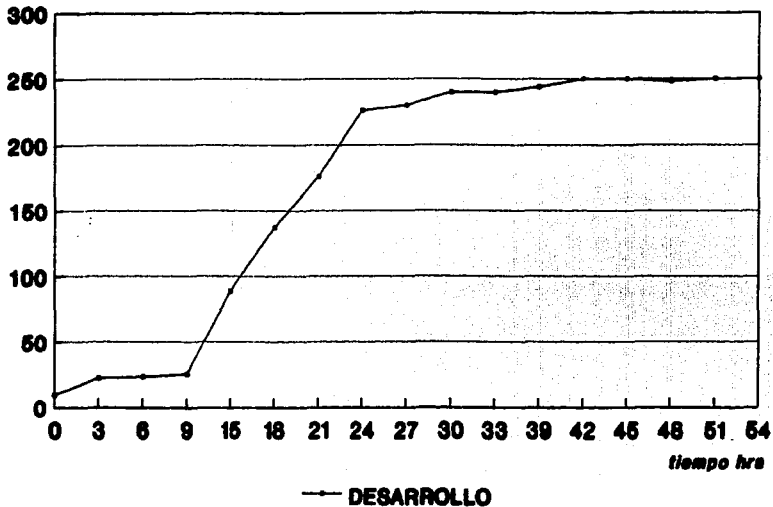


Tabla 7.

Resultados de los parámetros evaluados durante la hidrólisis del almidón y la Fermentación Láctica

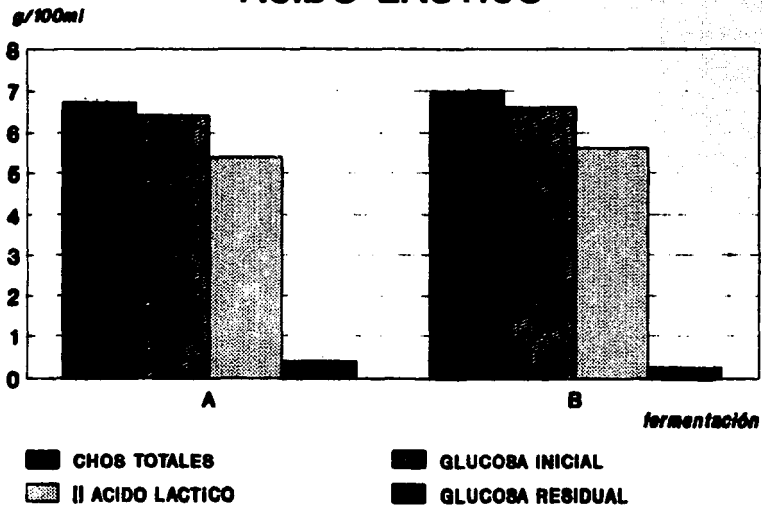
Fermentación	Carbohidratos Totales	Glucosa Inicial g/100ml	Acido Láctico	Glucosa Residual
A	6.72	6.40	5.382	0.400
B	6.98	6.60	5.615	0.273

Tabla 8.

Resultados de porcentos de transformación del sustrato y rendimiento obtenido del producto

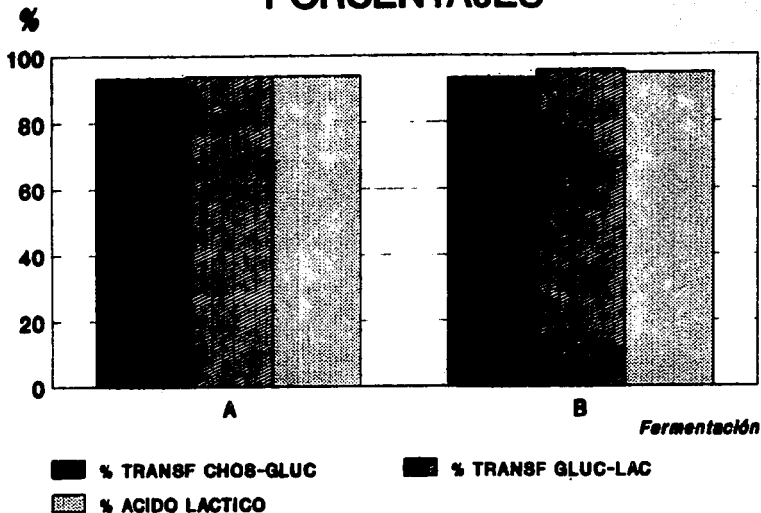
Fermentación	Transformación Carbohidratos a Glucosa	Transformación Glucosa a Acido Láctico	Rendimiento Acido Láctico
A	93.51%	93.92%	93.99%
B	93.34%	95.60%	94.64%

FERMENTACIONES ACIDO LACTICO



GRAFICA 4

FERMENTACIONES PORCENTAJES



GRAFICA 5

A continuación se exponen los resultados obtenidos en el Laboratorio de Microbiología Experimental respecto a la Hidrólisis de almidón realizada con Enzimas no purificadas de Aspergillus niger los que se comparan con los obtenidos en el presente trabajo que constituye la tercera etapa del proyecto.

Tabla G.

Rendimiento de Glucosa a diferentes periodos de incubación.

Tiempo de Incubación (horas)	* Enzima no Purificada	** Enzima Purificada
	g de glucosa/100ml	
0	-	
8	0.55	
17	2.07	
22.5	2.27	
26.5	2.36	
27	N.D.	4.60
32	2.06	
38.5	1.15	
48	0.37	
51		6.50
75		6.88
99		7.14

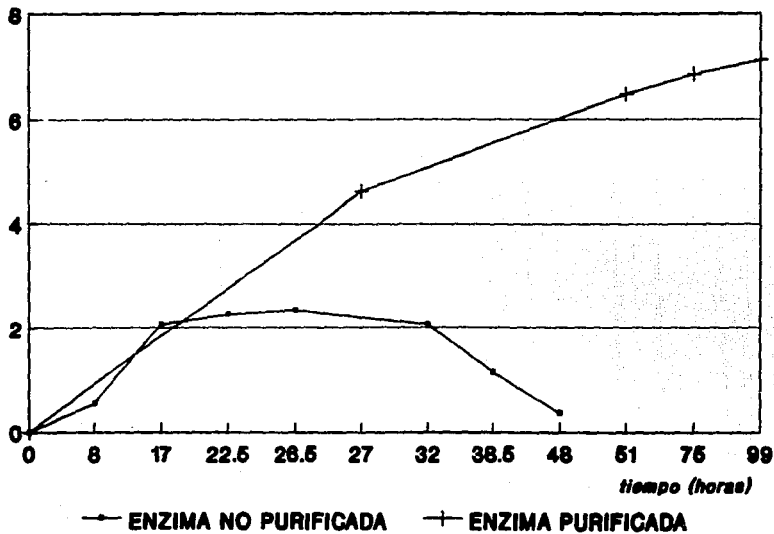
* Datos reportados por Paez y Ramirez (32)

** Se reporta la media de cuatro experimentos

N.D. = No determinada

COMPARACION DEL RENDIMIENTO DE GLUCOSA A DIFERENTES PERIODOS DE INCUBACION

g/100ml



GRAFICA 6

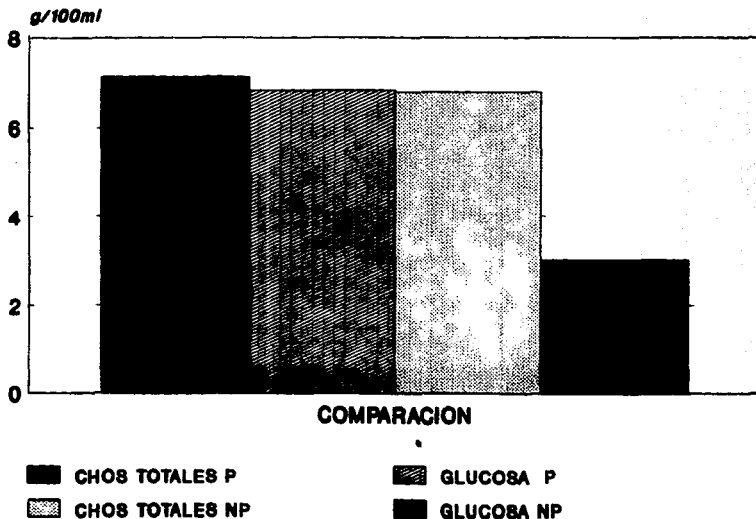
Tabla 10.

Comparación de la transformación de Carbohidratos a glucosa con enzimas purificadas y no purificadas

* Enzima no Purificada		Enzima Purificada	
Carbohidratos Totales	Glucosa	Carbohidratos Totales	Glucosa
	g/100ml		
4.77	2.305	7.20	6.876
7.4	4.44	7.65	7.40
7.56	2.32	6.72	6.40
7.42	2.89	6.98	6.605
<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
6.78	3.011	7.137	6.820
% de			
Transformación	44.41%		95.55%

* Datos reportados por Alejandro Moncayo alumno de Servicio Social que participó en este proyecto.

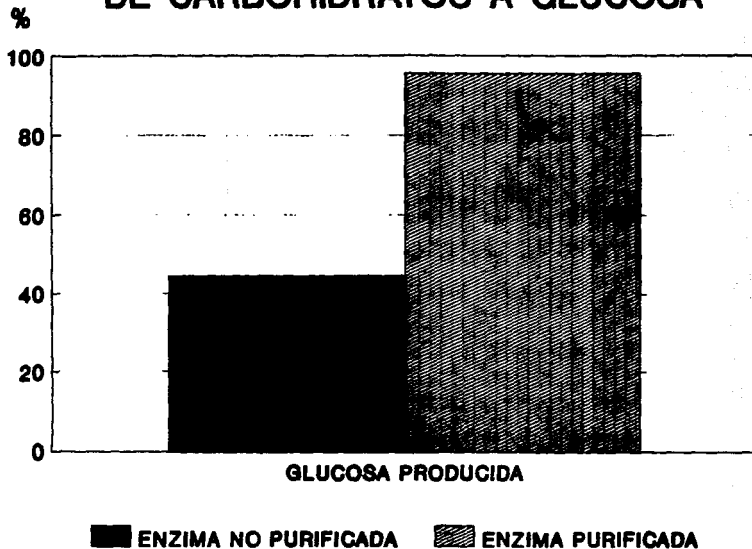
TRANSFORMACION DE CARBOHIDRATOS A GLUCOSA CON ENZIMAS



GRAFICA 7

P-ENZIMA PURIFICADA NP-ENZIMA NO PURIFICADA

PORCENTAJE DE TRANSFORMACION DE CARBOHIDRATOS A GLUCOSA



GRAFICA 8

V.- DISCUSION DE RESULTADOS

DISCUSION DE RESULTADOS

En cuanto a los resultados obtenidos en la determinación de almidón en diversas variedades de papa se puede observar que el método empleado tiene un grado de reproducibilidad confiable ya que el contenido de almidón reportado para la papa es de 18 a 20g % y los resultados obtenidos en este experimento, fluctúan entre 15.5 y 17.5g %.(Tabla 2)

Al inicio de cada fermentación se hizo la determinación de Carbohidratos totales los que resultaron alrededor de 7g/40g de papa. (Tabla 3)

Esta determinación constituye una herramienta importante para poder tener una referencia de la transformación de esos carbohidratos a glucosa y con ello valorar el rendimiento de la acción enzimática. En este sentido se observa que la transformación de carbohidratos por acción de enzimas purificadas es casi total. (Tabla 8 y Gráfica 8)

Las observaciones microscópicas, así como los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas, permitieron confirmar la pureza de la cepa y que ésta conservó sus características metabólicas. (Tabla 5)

Respecto a la curva de crecimiento de Lactobacillus delbruekii con la que fué posible conocer el momento en el que el microorganismo llegaba al final de la fase log y principio de la fase estacionaria, tiempo en el cual el microorganismo comienza a producir el ácido láctico como un producto de su metabolismo secundario, se tiene que éste se alcanzó a las 24 horas de incubación. (Tabla 8 y Gráfica 3)

Una vez obtenidos estos objetivos, se llevó a cabo la fermentación Láctica usando como materia prima la glucosa producida durante la hidrólisis de la papa con enzimas purificadas. Los rendimientos de ácido Láctico fueron entre 93.99% y 94.64%. (Tabla 8 y Gráfica 5)

Así mismo al hacerse los cálculos en cuanto al porcentaje de transformación de glucosa a ácido Láctico se encontró que estos porcentajes oscilaron entre 93.92% y 95.60%. (Tabla 8 y Gráfica 5)

Al comparar los resultados de trabajos previos con los aquí obtenidos, se observa que el tiempo de hidrólisis al que se obtiene el mayor contenido de glucosa con enzimas no purificadas corresponde a 20.5 horas y que con períodos de incubación mayores el rendimiento disminuye considerablemente, lo que se atribuye a su utilización por los microorganismos productores de las enzimas. En tanto que con enzimas

purificadas, a las 27 horas el rendimiento es casi del 200% y con periodos de incubación más prolongados continua aumentando la concentración, alcanzándose practicamente la producción óptima a las 51 horas. (Tabla 9 y Gráfica 6)

Al comparar los resultados de glucosa obtenidos con enzimas purificadas y con enzimas no purificadas se aprecia una visible diferencia, siendo las concentraciones de glucosa obtenidas con enzimas purificadas muy superiores a las resultantes con enzimas no purificadas. (Tabla 10 y Gráfica 7)

El porcentaje de transformación de carbohidratos a glucosa en el proceso con enzimas purificadas está entre el 93 y 95.6%. (Tabla 8)

Por estas razones se puede opinar que al usar enzimas purificadas en el proceso de hidrólisis de almidón se logra favorecer el proceso fermentativo en su conjunto.

VI.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La conclusión general a la que se llegó al obtener una transformación casi total de almidón a glucosa al finalizar este trabajo, se resume en que el uso de enzimas purificadas en este tipo de procesos es más redituable.

La ventaja principal en relación con el proceso que usa enzimas no purificadas, es el alto rendimiento de glucosa, ya que en el proceso que involucra a las enzimas no purificadas se está usando al hongo *Aspergillus niger* (productor de la enzima amilolítica) el cual al mismo tiempo que libera la enzima degradadora del almidón para producir glucosa, se está alimentando con parte de esa glucosa liberada lo cual repercute en un bajo rendimiento de ésta.

El alto costo que tienen las enzimas purificadas se reduce considerablemente al utilizarse éstas en cantidades muy pequeñas.

Uno de los puntos que podría ser una desventaja al usar enzimas purificadas, es el tiempo de hidrólisis, que para éstas es de 75 horas y para las enzimas no purificadas es de 25.5 horas, pero el alto rendimiento producido por las primeras retribuye el mayor tiempo invertido en su uso.

La comparación en el uso de enzimas purificadas y no purificadas en la hidrólisis de almidón de papa indica que las primeras son mucho más útiles para estas aplicaciones, por lo que se recomiendan como una buena alternativa.

VI.- APENDICE

APENDICE

7.1.-METODOS

7.1.1. Curva Patrón de Almidón

Sustancias

Solución de almidón soluble: Agregar 0.1g de almidón soluble a 100ml de agua destilada para obtener una concentración final de 0.1%

Reactivo de Yodo: Para preparar 30 ml de este reactivo se utilizan 0.2 g de KI y 0.1g de I₂. Disolver el KI en 0.34 ml de agua, llevarlo a 10ml, agregar 0.1g de I₂ y aforar a 30 ml.

Desarrollo de la Curva

Matraz	Vol. de almidón al 0.1%	Vol. de reactivo de yodo	g de almidón soluble
1	0	0.5	0
2	0.5	0.5	0.0005
3	1.0	0.5	0.0010
4	1.5	0.5	0.0015
5	2.0	0.5	0.0020
6	2.5	0.5	0.0025
7	3.0	0.5	0.0030

Hacer las lecturas en un Nefelómetro Klett y utilizar filtro rojo.

7.1.2.-Extracción del Almidón de la Papa. (42)

Para esto, la preparación de la muestra se hizo de la siguiente manera: 1g de papa se licuó con 25 ml de agua destilada y se calentó en baño de agua hirviendo durante 10 minutos, al término de los cuales se filtró la mezcla a través de fibra de vidrio. Parte del almidón solubilizado por el calentamiento atraviesa la fibra de vidrio, pero al irse enfriando parte de él queda atrapado en la fibra de vidrio, por lo cual dicho residuo fue recuperado lavando con 25 ml de agua destilada. Se procedió a calentar durante 10 minutos a temperatura de ebullición y a filtrar nuevamente. Esta operación se repitió dos veces más y finalmente se juntaron los cuatro filtrados (100 ml) de ahí se tomaron 50 ml. Con el objeto de poder realizar la cuantificación colorimétrica del almidón, se procedió a disminuir la concentración de éste en la alícuota original, para lo que se hicieron una serie de diluciones, en la que se desarrolló el complejo colorido mediante la adición de 0.5 ml de reactivo de yodo.

Las lecturas se hicieron en el Nefelómetro Klett leyendo con filtro rojo y los resultados se interpolaron en la curva patrón.

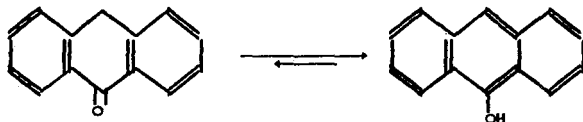
7.1.3. -Determinación de Carbohidratos Totales por el Método de Antrona. (12,30,32)

Fundamento

Los carbohidratos dan un color verde característico con antrona en solución de ácido sulfúrico con adición de calor.

El color es debido a la condensación de la antrona con los derivados del furfural formados en la reacción de los azúcares con el ácido caliente.

La forma antronal es la que reacciona.



Reactivos

1.-Solución estandar de glucosa (1.0mg/ml) en una solución al 0.15% de ácido benzoico es estable por un tiempo prolongado a 0°C.

2.-Solución stock de ácido sulfúrico (75% v/v) añadir 750 ml de ácido sulfúrico a 250 ml de agua destilada.

3.-Reactivo de antrona. Agregar 5ml de etanol absoluto a 200mg de antrona, agitar hasta disolución. Este reactivo se prepara inmediatamente antes de su uso. El etanol sirve para estabilizar el color. Leer el problema y el estandar contra un blanco de agua para tener mayor especificidad y evitar las sustancias interferentes.

Los disacáridos y polisacáridos dan cuantitativamente el mismo valor de color por mol de glucosa.

	Blanco	Problema	Estandar
Agua	1.0ml		
Suspensión de papa		1.0ml	
Estandar de glucosa(1:20)			1.0ml
Baño de hielo			
Reactivo de antrona	5ml	5ml	5ml
Baño de agua en ebullición 10 minutos. Enfriar en baño de hielo y leer en el Klett con filtro rojo			

Cálculo:

$$\frac{\text{D.O. Problema}}{\text{D.O. Estandar}} \times 5 = \text{Concentración de CHO's totales g/100ml}$$

Tratamiento de la muestra: Del macerado de papa se toma 1ml se afora a 100ml con agua destilada y de ahí se toma la muestra la cual se centrifuga y se desarrolla el método.

La antrona debe agregarse lentamente con agitación.

7.1.4. -Determinación de Glucosa por el Método de Nelson
Somogyi. (S,22,29)

Fundamento

La presencia de grupos reductores libres en una muestra de carbohidrato tiene la capacidad de reducir el Cu^{2+} en medio alcalino. El hidrato de carbono se degrada oxidativamente con la correspondiente reducción del agente oxidante. El Cu^+ formado precipita como Cu_2O dando una coloración rojiza. La cantidad de Cu_2O formado se mide adicionando ácido arsenomolibdico que es reducido por el Cu^+ . El color azul intenso del ácido arsenomolibdoso se determina por colorimetría.

Reactivos

1.-Reactivo alcalino de cobre

Reactivo A (100 ml)

2.5 g de Na_2CO_3 (anhidro)

2.5 g de sal de Rochelle (Tartrato de sodio y potasio $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

2.0 g de NaHCO_3

20 g de Na_2SO_4 (anhidro)

Disolver las sales en el orden indicado y aforar a 100ml. Se filtra si es necesario y guardar en frasco ambar a una temperatura de $15-20^\circ$.

Reactivo B (100ml):

15 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

100 ml de agua destilada

2 gotas de H_2SO_4 concentrado

Guardar en frasco ámbar.

Las soluciones A y B se mezclan en el momento de hacer la determinación de la siguiente forma:

25 partes de A por 1 parte de B

2.-Reactivo arsenomolibdico

5g de Molibdato de Amonio

95 ml de agua destilada

4.2 ml de H_2SO_4 concentrado

0.6 g de $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ (Arsenato de sodio
dibásico)

Preparación

Disolver 5g de molibdato de amonio en 90 ml de agua destilada. Adicionar 4.2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Adicionar (previamente disueltos) en 5ml de agua, 0.6 g de arsenato de sodio, mezclar por agitación cuidadosa y poner en una incubadora a $37^\circ C$ durante 48 horas. Guardar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

3.-Solución patrón de glucosa.

200mg de glucosa anhidra

100ml de solución de ácido benzóico al 0.25%

Se diluye 1:20 en el momento de la prueba

4.-Sulfato de Zinc al 5%

5g de Sulfato de zinc

100 ml de agua destilada

5.-Hidróxido de Bario 0.3N

5g de Hidróxido de Bario

100ml de agua destilada.

Diluir el problema 1:20 antes de desproteínizar.

Técnica de desproteínización

Problema (1:20)	0.5 ml
Agua destilada	7.5 ml
Hidróxido de Bario 0.3N	1.0 ml
Sulfato de Zinc al 5%	1.0 ml
Filtrar y centrifugar	

	Problema	Patrón	Blanco
Filtrado libre de proteínas	1.0ml		
Solución patrón Dil 1:20		1.0ml	
Agua destilada			1.0ml
Reactivo alcalino de cobre	1.0ml	1.0ml	1.0ml
Mezclar y calentar en baño de agua a ebullición por 20 min.			
Enfriar en baño de hielo			
Reactivo arseno molibdico	1.0ml	1.0ml	1.0ml
Agitar cuidadosamente hasta desalojar gas			
Agua destilada	22.0ml	22.0ml	22.0ml
Ajustar a 100% de Transmisión con el blanco y obtener las lecturas para problema y patrón a una λ de 520nm ó con filtro verde en el nefelómetro Klett.			

$$\frac{\text{UK Problema}}{\text{UK Patrón}} = 200 = 20 = \text{mg de glucosa/100ml}$$

7.1.5. -Cuantificación de Acido Láctico por el Método de Nanni Baldini. (12,31,32)

El fermentado original se diluye con agua destilada en una proporción de 1:10.

La desproteínización se realiza con los reactivos para desproteínizar en el método de Nelson Somogyi. Al hacerla la muestra se diluye 1:20.

Fundamento

La muestra desproteínizada se trata con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para eliminar el piruvato interferente. Así el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se añade conjunto con H_2SO_4 concentrado el cual bajo la influencia del calor convierte el ácido Láctico en acetaldehído. Este reacciona con p-hidroxidifenilo produciendo un cromóforo violeta, que tiene su máxima absorción a 568nm.

Reactivos

1.-Solución patrón de Acido Láctico. 0.2133g de lactato de litio seco. Se disuelven en 100ml de agua destilada junto con 1ml de H_2SO_4 . Se lleva a un volumen final de 1 litro con agua destilada quedando una concentración final de 20mg/100ml.

2.-Solución de p-hidroxidifenilo. 150mg de p-hidroxidifenilo se disuelven en 10ml de etanol absoluto.

- 3.-Solución de Sulfato de cobre. $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ al 20% (p/v)
- 4.-Solución de Sulfato de cobre. $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ al 15% (p/v)
- 5.-Hidróxido de calcio Q.P.
- 6.-Acido Sulfúrico concentrado.

Procedimiento

Las determinaciones se realizan con la solución patrón, muestra problema y blanco simultáneamente.

Colocar en un tubo de 15x110 ml de solución libre de proteínas conteniendo de 10 a 200mg de Acido Láctico. Agregar 1ml de Sulfato de Cobre al 20% y llevar a un volumen final de 10ml con agua destilada.

Adicionar 1g de Hidróxido de Calcio, tapar los tubos y agitar vigorosamente por periodos de 30 segundos a intervalos de 5 minutos, por 30 minutos; centrifugar los tubos.

Transferir 1ml del sobrenadante a un tubo de 15x180mm, enfriar en un baño de hielo y se añadir 0.05ml de sulfato de cobre al 15% seguido por 6ml de ácido sulfúrico concentrado que se añade lentamente con agitación continua, goteando de una bureta. Cuando todo el ácido se ha añadido, los tubos se

agitan vigorosamente, se tapan y se transfieren a un baño de agua a $60^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, enfriar a una temperatura de 8 a 10°C y agregar 0.1ml de p-hidroxidifenilo y agitar vigorosamente.

Colocar los tubos en un baño de agua a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos seguido por 90 segundos de baño de agua a ebullición, con este tratamiento se elimina el exceso de p-hidroxidifenilo.

Inmediatamente después enfriar los tubos en un baño de hielo y medir la extinción a 668nm, contra blanco de reactivos. En el nefelómetro Klett leer los tubos con el filtro verde.

Calculo:

$\frac{\text{UK Problema}}{\text{UK Patrón}} = [\text{I}] \text{ del patrón} \times \text{dilución}$

UK Patrón

$\frac{\text{UK Problema}}{\text{UK Patrón}} = 20 \times 200 = \text{mg de ac. Lactico/100ml}$

7.2.-ENZIMAS UTILIZADAS

7.2.1.-Nombre comercial: Takatherm

Es una α -amilasa bacteriana de Bacillus licheniformis altamente termoestable, para su máxima protección contra la desnaturalización bajo condiciones extremas de pH y temperatura requiere trazas de Calcio en una concentración de 400 ppm (400mg/l). Las sales de Calcio fácilmente solubles en agua como el Cloruro son adecuadas como cofactor. La afecta demasiado el EDTA (secuestrante de Calcio).

Inhibidores: Cu, Fe, Co con poder inhibitorio moderado

Al, Pb, Zn con poder inhibitorio fuerte

Para su actividad se recomiendan dosis de 0.5-1.5 L/1000kg de almidón.

Temperatura óptima	90°C
Rango de Temperatura óptima	85-95°C
Estabilidad	hasta 95°C
Rango efectivo	hasta 100°C
pH óptimo	5.5-7.0
pH efectivo	5.0-8.0
Rango de estabilidad al pH	5.0-11.0

7.2.2. -Nombre comercial: **Diazime L200**

Es una glucoamilasa fungal de Aspergillus niger la cual no requiere de cofactores para su funcionalidad.

Temperatura óptima 55-65°C

Temperatura efectiva 40-65°C

Temperatura recomendada para un tiempo de reacción mayor a 24 horas Cya que es muy estable y se reduce el peligro de contaminación microbiana 60°C

Temperatura de inactivación Superior a 80°C

pH óptimo 4.0-4.4

pH efectivo 3.0-5.0

pH de estabilidad máxima 3.5-5.5

pH estable 4.0-5.0

Para evaluarla se usan 0.015% de enzima.

7.3. - Medios de Cultivo

7.3.1. - Medio de Cultivo MRS. (14)

(Para Conservación de la Cepa)

Leche peptonizada.....	1g
Extracto de carne.....	1g
Extracto de Levadura.....	0.5g
Glucosa.....	2g
Fosfato dipotásico K_2HPO_4	0.5g
Citrato diamónico.....	0.2g
Acetato de sodio CH_3COONa	0.5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.02g
Tween 80.....	0.1g
Agua destilada.....	100 ml

Ajustar el pH a 6.2-6.4. Esterilizar a $121^{\circ}C$ durante 15 minutos.

7.3.2. - Medio # 3. (12,32)

(Para Propagación de la Cepa)

Extracto de Levadura.....	2g
Glucosa.....	2g
Solución A de sales.....	0.66ml
Solución B de sales.....	0.74ml
Agua destilada.....	100ml

Ajustar el pH de 5.5-6. Esterilizar a $120^{\circ}C$ durante 15 minutos.

7.3.3.-Preparación de las Soluciones de Sales.

(12,32)

Solución A de sales	Solución B de sales
MgSO ₄ .7H ₂ O.....10g	Acetato de sodio....12.5g
FeSO ₄ .7H ₂ O..... 0.5g	Tween 80..... 0.5g
MnSO ₄ .4H ₂ O..... 0.5g	Agua destilada.....100ml
Agua destilada.....100ml	

7.3.4.-Medio de Cultivo MRS. (14)

(Para pruebas bioquímicas)

Peptona de caseína.....	10g
Extracto de carne.....	2g
Extracto de levadura.....	5g
K ₂ HPO ₄	5g
Citrato de amonio.....	2g
Acetato de Sodio.....	5g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.5g
MnSO ₄ .4H ₂ O.....	0.2g
Tween 80.....	1g
Agua destilada.....	1000ml

Ajustar el pH a 6.2-6.4. Adicionar el colorante Rojo de Clorofenol en una concentración de 0.05%. Distribuir en matraces. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Después agregar en condiciones asepticas las soluciones de Carbohidratos problema previamente esterilizadas por filtración.

7.3.5. -Medio de Fermentación Láctica

(32)

Agua de Levadura.....	15 ml
Hidrolizado de papa.....	100ml
CaCO ₃	2g
Solución A de sales.....	0.88ml
Solución B de sales.....	0.74ml
Inóculo de <i>L. delbrueckii</i>	5% (v/v)

Ajustar pH a 6. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

7.3.6. -Preparación del agua de Levadura

Levadura de panificación.....	20g
Agua destilada.....	100ml

Esterilizar durante 2 horas a 121°C.

VII.- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allen and Thoma (1978)
Model for carbohydrase action A. oryzae α -amylase
degradation of maltotriose
Biochemistry Vol. 17 No. 12 Pags. 2345-2350
- 2.- Bajpai P. and Bajpai P.K. (1980)
High temperature alkaline α -amylase from Bacillus
licheniformis TCRDC-B-13
Biotechnology and Bioengineering . Vol 33 pags 72-78
- 3.- Bergmeyer H.U. (1983)
Methods of Enzymatic Analysis
Verlag Chemie Weinheim Deerfiel. Beach Florida
Vol 2 pags. 151-154
- 4.- Caldwell M.L, Weill C.E. and Weil R.S. (1945)
Further studies of the essential groups of pancreatic
 α -amylase.
Journal of the American Chemical Society (JACS)
Vol 67 pags. 1079-1088
- 5.- Clark J.M. (1966)
Bioquímica Experimental
Editorial Acribia Zaragoza España
Pags. 27-29
- 6.- Conn E.E., Stump P.K. (1977)
Bioquímica Fundamental
3^o Edición . Editorial Limusa México
Pags. 63-66

7. - Chen, GuanJun, Luo, Guimin, Chen, Yuhua (1991)
Purification and characterization of glucoamylase of A. niger.
Jilin Daxue Ziran Kexue Xebao
Chemical Abstracts Vol 114 .extracto 20683a
8. - ENMEX (1989)
Información técnica sobre Takatherm y Diazyme L-200
ENMEX S.A. de C.V.
Río Lerma # 228, CP 54030 Tlalnepantla Edo de México
9. - Enzyme Nomenclature of International Union of
Biochemistry (1979)
Enzyme Nomenclature
Academic Press N.Y. ,San Francisco, London
10. - Fischer H., Stein E.A. (1980)
 α -Amylases .In The Enzymes
Boyer Lardy Myrback 2^o Edición. Academic Press
London and N.Y.
Vol 4 Cap. 19 Pags. 313-343
11. - Fujii M., Kawamura Y. (1985)
Synergistic action of α -amylase and glucoamylase on
hydrolysis of starch
Biotechnology and Bioengineering. Vol 27 pags 260-265
12. - Garduño Torres L (1984)
Biosíntesis microbianana del Acido Láctico a partir de
papa.
Tesis de Q.F.B. Facultad de Química UNAM México D.F.

13. - Hofstee B.H.J. (1958)
Kinetics of β glucosidase on the basis of intermediate Enzyme-glucoside formation.
Journal of the American Chemical Society (JACS)
Vol 80 pags 3906-3909
14. - Holt J.G., Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. (1980)
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
Editado por Board Williams and Wilkins
Baltimore, London, Los Angeles, Sydney.
Vol 2 pags 1209-1223
15. - Kerr R.W., Cleveland F.C., Katzbeck W.J. (1951)
The action of amylo-glucosidase on amylose and amylopectin.
Journal of the American Chemical Society (JACS)
Vol. 73 pags. 3916-3921
16. - Kuhn H., Fietzek P.P. and Kampen J.O. (1984)
N-terminal aminoacid sequence of Bacillus licheniformis
 α -amylase. Comparison with Bacillus amyloliquefaciens and
Bacillus subtilis enzymes.
Journal of Bacteriology. Vol 149 No 1 pags 372-373
17. - Kulp Karel (1975)
Enzymes in food processing. Food science and technology.
A series of Monographs.
2^o Edición Editado por Gerald Reed. Universal Foods
Corporation. Milwaukee Wisconsin Academic Press N.Y.
Pags. 58-79
18. - Larner J. and Schliselfeld L.S. (1956)
Studies on amylo-1,6 glucosidase
Enzymes and Metabolism. Biochimica et Biophysica ACTA
Vol. 20 No.1 pags. 53-61

- 10.- Lehninger (1982)
Bioquímica
2^o Edición. Editorial Omega.
Barcelona España
pags. 270-272
- 20.- Lenders J.P., Crichton R.R. (1988)
Chemical stabilization of glucoamylase from Aspergillus niger against thermal inactivation.
Biotechnology and Bioengineering. Vol 31 pags 267-277
- 21.- Little J.E., Caldwell M.L. (1942)
A study of the action of pancreatic amylase
Journal of Biological Chemistry (JBC)
Vol 142 pags. 583-593
- 22.- Manual de Prácticas de Análisis Bioquímico Clínicos.
(1984)
Facultad de Química
UNAM
- 23.- Mayer F.C. and Larner J. (1960)
Substrate cleavage point of the α and β amylases
Journal of the American Chemical Society (JACS)
Vol. 81 pags. 188-193
- 24.- Meagher M.M., Nikolov Z.L., Reilly P.J. (1989)
Subsite mapping of Aspergillus niger Glucoamylases I and II with malto and isomaltooligosaccharides.
Biotechnology and Bioengineering.
Vol 34 pags 681-688

25. - Meagher M.M., Nikolov Z.L., Reilly P.J. (1989)
Kinetics, equilibria and modeling of the formation of oligosaccharides from D-glucose with Aspergillus niger glucoamylases I and II.
Biotechnology and Bioengineering. Vol 34 pags 694-704
26. - Meagher M.M., Reilly P.J. (1989)
Kinetics of the hydrolysis of di and trisaccharides with Aspergillus niger Glucoamylases I and II.
Biothecnology and Bioengineering. Vol 34 pags 689-693
27. - Needa S. and Chandra A.K. (1980)
New strains of Bacillus licheniformis and Bacillus coagulans producing thermostable α -amylase active at alkaline pH.
Journal of Applied Bacteriology. Vol 48 pags 47-48
28. - Morrison and Boyd (1970)
Química Orgánica
Fondo Educativo Interamericano
Bogotá, Caracas, México, Panamá
pags. 1148-1154
29. - Nelson N. (1944)
A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose.
Journal of Biological Chemistry (JBC)
Vol. 153 pags. 375-380
30. - Norris J.R., Ribbons D.W. (1970)
Methods in Microbiology
Academic Press. London and N.Y.
Vol 5B pags 265-270

31. - Norris J.R., Ribbons D.W. (1970)
 Methods in Microbiology
 Academic Press. London and N.Y.
 Vol 6A pags. 155-178
32. - Paez Gonzalez S., Ramirez Orozco J.G. (1968)
 Producción de Acido Láctico a partir de un hidrolizado
 enzimático de papa.
 Tesis de Q.F.B. Facultad de Química. UNAM México D.F.
33. - Pazur J.H. (1972)
 Glucoamylase from Aspergillus niger. (Assay method,
 purification, procedure, properties)
 Methods in Enzymology
 Colowick and Kaplan Academic Press. London and N.Y.
 Vol. 28 Part. B pags.(931-934)
34. - Pazur J.H., Ando T. (1960)
 The hydrolysis of glucosyl oligosaccharides with α -DC1-4)
 α -D-(1-6) bonds by fungal amyloglucosidase.
 Journal of Biological Chemistry (JBC)
 Vol 238 No.2 Pags. 297-302
35. - Pazur J.H., Ando T. (1959)
 The action of an amyloglucosidase of Aspergillus niger on
 starch and maltooligosaccharides.
 Journal of Biological Chemistry (JBC)
 Vol 234 No.8 Pags. 1986-1970
36. - Pazur J.H., Kleppe K. (1962)
 The hydrolysis of α -D-glucosides by amyloglucosidase from
Aspergillus niger.
 Journal of Biological Chemistry. (JBC)
 Vol. 237 No. 4 Pags. 1002-1008

- 37.- Pazur J.H., Okada S. (1966)
 A novel method for the action patterns and the
 differentiation of α -1,4 glucanhydrolases.
 Journal of Biological Chemistry (JBC)
 Vol. 241 pags. 4146-4151
- 38.- Rothstein D.N., Devlin P.E., Cate R.L. (1966)
 Expression of α -amylase in Bacillus licheniformis.
 Journal of Bacteriology
 Vol. 158 No. 2 pags. 839-842
- 39.- Stephens M.A., Ortlepp S.A., Ollington J.F., Mc Connell
 D.J. (1984)
 Nucleotide sequence of the 5' region of the Bacillus
licheniformis α -amylase gene comparison with the Bacillus
amyloliquefaciens gene.
 Journal of Bacteriology. Vol 158 No. 1 pags 369-372
- 40.- Stryer (1988)
 Biochemistry
 3^o Edición . Ed. W.H. Freeman and Company/New York.
 Parte III Cap. 14 pags 341-342
- 41.- Takagi T., Toda H., Isemura T. (1971)
 Bacterial and Mold Amylases In: The Enzymes.
 Boyer 3^o Edición. Academic Press N.Y. and London
 Vol. 5 Cap. 8 pags. 236-271
- 42.- Trop M., Grossman S. (1972)
 Food composition. Determination of starch by glucose
 oxidase and polarographic measurement.
 Journal of the AOAC
 Vol. 55 No. 6 pags 1161-1163

43. - Van Beynum G.M.A., Roels J.A., Van Tilburg R. (1980)
Equilibrium relationships in the degradation of starch by
an amyloglucosidase.
Biotechnology and Bioengineering.
Vol. 22 pags. 643-649
44. - Van Dyk J.W., Tungkung J.H., Caldwell M.L. (1956)
Influence of the extent of hydrolysis upon the
determination of the initial velocity of α -amylase
action.
Journal of the American Chemical Society (JACS)
Vol. 78 pags 3343-3344
45. - Weill C.E., Burch R.J. and Van Dyk J.W. (1954)
An α -amyloglucosidase that produces β -glucose
Cereal Chem. Vol 31 No 2 pags. 150-158
46. - Yoo J.Y., Hong J., Hatch R.T. (1987)
Comparison of α -amylase activities from different assay
methods.
Biotechnology and Bioengineering.
Vol. 30 pags 147-151