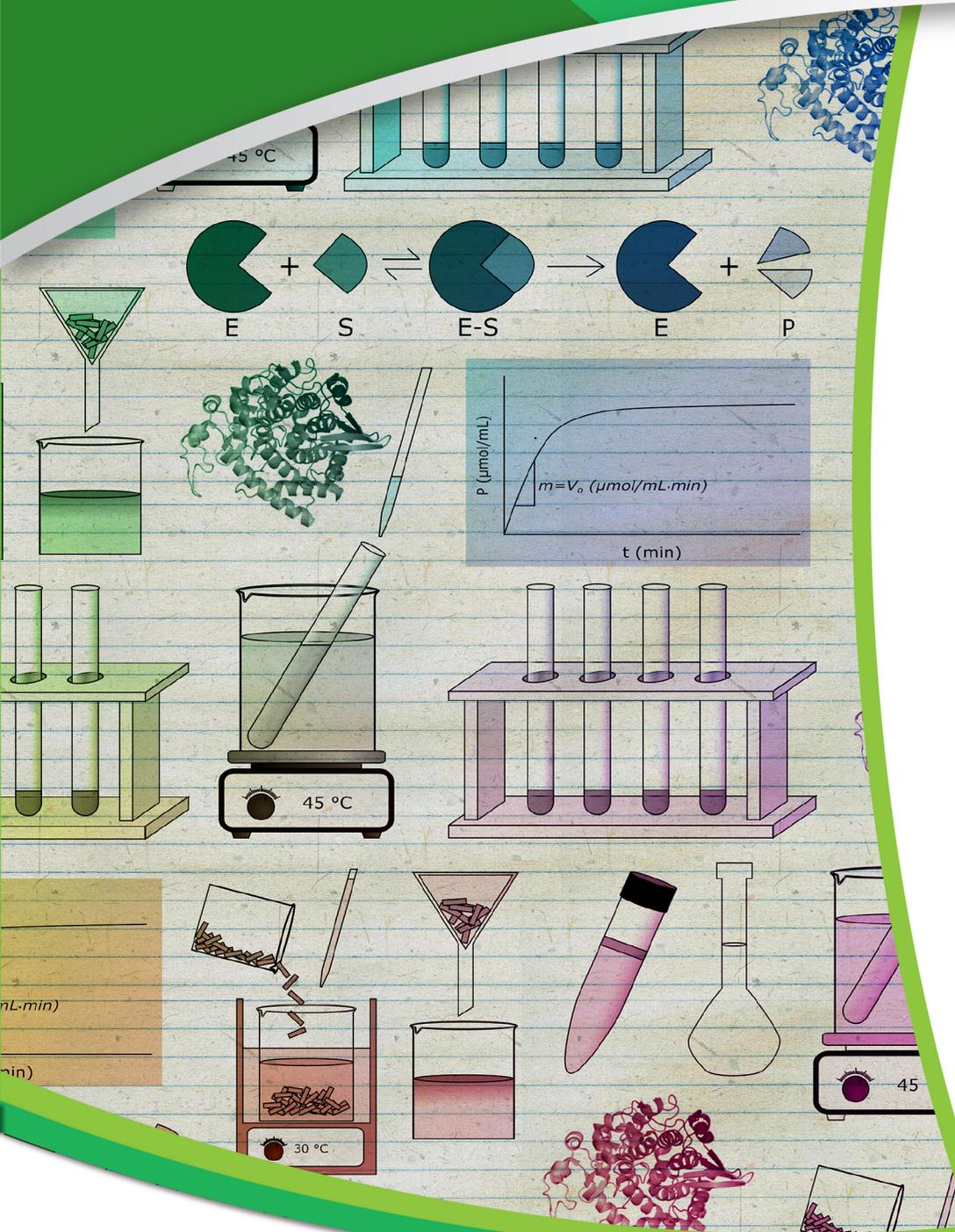


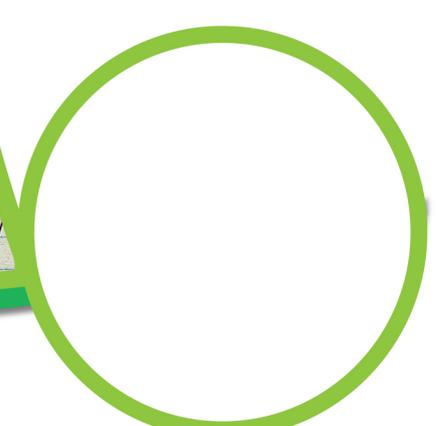
# Tecnología Enzimática



Alma Elizabeth  
**Cruz Guerrero**

Francisco Javier  
**Guzmán Rodríguez**

Lorena del Carmen  
**Gómez Ruiz**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA

RECTOR GENERAL

Dr. José Antonio De Los Reyes Heredia

SECRETARIO GENERAL

Dra. Norma Rondero López

UNIDAD IZTAPALAPA

RECTORA

Dra. Verónica Medina Bañuelos

SECRETARIO

Dr. Juan José Ambríz García

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE C.B.S.

Dr. José Luis Gómez Olivares

COORDINADOR DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Mtro. Federico Bañuelos Bárcena

JEFE DE LA SECCIÓN DE PRODUCCIÓN EDITORIAL

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas

Primera edición 2022

ISBN: 978-607-28-2725-7

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco, Núm. 186, Col. Leyes de Reforma 1A Sección,  
Alcaldía Iztapalapa, C.P. 09310, Ciudad de México. Tel.: 5804 4600

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

## Índice

Prólogo .....	5
Medidas de seguridad .....	7
Práctica 1. Determinación de la velocidad inicial ( $V_0$ ) de una reacción enzimática .....	11
Práctica 2. Influencia de la concentración de sustrato en la velocidad inicial de una reacción enzimática. Determinación de $K_M$ y $V_{max}$ .....	15
Práctica 3. Efecto de la temperatura en la velocidad inicial de una reacción enzimática .....	21
Práctica 4. Efecto del pH en la velocidad inicial de una reacción enzimática .....	27
Práctica 5. Inmovilización de enzimas .....	33
Práctica 6. Clarificación de jugo de manzana .....	37
Práctica 7. Producción de enzimas .....	39
Práctica 8. Extracción de aceites esenciales de cítricos .....	43
Práctica 9. Hidrólisis de la lactosa en leche .....	47
ANEXO 1 .....	49



## Prólogo

Este manual de prácticas de laboratorio ha sido concebido en apego al contenido de la Unidad de Enseñanza y Aprendizaje (UEA) de Tecnología Enzimática, que forma parte del programa de la Licenciatura de Ingeniería de los Alimentos de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS) de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)-Iztapalapa. Las prácticas que contiene se adecuaron y actualizaron para fortalecer la formación académica de los alumnos y las alumnas mediante el desarrollo experimental que permite conocer los factores principales que afectan a las reacciones enzimáticas, así como algunas aplicaciones de las enzimas en la industria alimentaria.

El manual contiene 9 prácticas en las que se incluye una introducción con el fundamento de cada tema, y se dan las indicaciones precisas para realizar cada experimento; con lo que el estudiante podrá reforzar los conocimientos adquiridos en la teoría. Además, también tienen un cuestionario y bibliografía actualizada que les servirá a los estudiantes para ampliar la información y complementar su reporte de laboratorio.

Asimismo, se incluyen los requisitos normativos para el uso de los servicios y las instalaciones, así como las medidas de seguridad y manejo de desechos conforme al "Instructivo del funcionamiento interno y operativo para regular el uso de los servicios e instalaciones de los laboratorios de docencia", aprobado por el Consejo Académico de la Unidad Iztapalapa (Sesión número 314, del 9 de noviembre del 2009).

La utilización de enzimas en la industria de alimentos ha sido fundamental en el desarrollo de procesos para mejorar las características sensoriales y nutricionales de distintos alimentos, así como para la obtención de diferentes compuestos utilizados como aditivos. Por esta razón, el presente manual contribuye a una buena formación académica de los futuros ingenieros en alimentos en esta área del conocimiento.



## Medidas de seguridad

Publicadas en el “Instructivo del funcionamiento interno y operativo” para regular el uso de los servicios e instalaciones de los Laboratorios de Docencia UAM-Iztapalapa (IFIO-LD-UAMI). Aprobado por el Consejo Académico de CBS en la sesión número 314 del 9 de noviembre de 2009.

### Anexo 2. Uso y manejo de materiales de vidrio y equipo de cristalería

1. Al cortar un tubo o varilla de vidrio se recomienda medir la longitud deseada y hacer una marca con una lima triangular, luego, envolviendo el tubo en una franela o protegiendo las manos con guantes de lona, quebrarlo en el lugar marcado (en caso de duda, consultar al profesor).
2. Antes de usar un segmento de tubo o varilla de vidrio recién cortado es necesario someter sus extremos a la llama de un mechero o soplete.
3. Al insertar un termómetro o tubo de vidrio en la horadación de un tapón deberá usarse algún lubricante, como glicerina o jabón. Protegiendo las manos con una franela o con guantes de lona, el tubo se empuja poco a poco, aplicando la fuerza cerca del tapón.
4. Queda prohibido el uso del material de vidrio astillado o estrellado, el cual deberá ser retirado por los laboratoristas.
5. Los matraces de fondo plano no deberán usarse en experimentos a presión o al vacío, a menos que estén contruidos expresamente para tal propósito. De cualquier manera, aun usando el material adecuado, siempre que el equipo de vidrio se someta a presión o a vacío, deberán tomarse las precauciones necesarias: instalar barricadas o caretas de plástico acrílico, usar anteojos protectores, envolver los matraces en malla de alambre o con cinta adhesiva, etc.
6. El transporte de garrafones de vidrio con reactivos o disolventes deberá hacerse en un carro de supermercado. Los frascos de 5 litros o menos deberán transportarse en canastillas metálicas.

### Anexo 5. Uso y manejo de sustancias y reactivos químicos

1. Los envases de reactivos que se conserven en el Laboratorio deberán tener, además de la etiqueta de los fabricantes, una o varias más que indiquen los riesgos en su manejo. Cada etiqueta contendrá una sola palabra en letras mayúsculas de color rojo. Ejemplo: VENENO, EXPLOSIVO, INFLAMABLE, CORROSIVO, de acuerdo con la clasificación de la NOM-052-SEMAR-NAT-2005.
2. Al manipular sustancias corrosivas será obligatorio el uso de equipo personal de protección.
3. Para transferir líquidos, especialmente los corrosivos o tóxicos, con ayuda de pipeta, ésta deberá llenarse con una propipeta. Queda estrictamente prohibido llenarlas succionando con la boca.
4. Al poner en contacto sustancias que reaccionen violentamente o al calentar líquidos en tubos de ensayo o frascos, la cara deberá apartarse para que no sea alcanzada por posibles salpicaduras. Se deben usar anteojos protectores o careta de plástico.
5. Todas las operaciones con sustancias volátiles deberán hacerse en la campana de extracción.
6. Los gases tóxicos que se produzcan o se usen en una reacción y que sean dirigidos a la campana de extracción deberán absorberse en un medio adecuado o transformarse en sustancias inocuas.
7. Queda estrictamente prohibido gustar o ingerir cualquier sustancia química.
8. Después de terminar un trabajo con sustancias químicas es necesario lavarse cuidadosamente las manos y la cara.
9. Queda prohibido usar los hornos o estufas de secado para calentar alimentos. También se prohíbe comer o beber en los utensilios de laboratorio.

10. Los productos químicos, deberán almacenarse organizadamente, cuidando que queden en áreas separadas los materiales que puedan reaccionar violentamente. Las bodegas de reactivos deberán estar fuera de los laboratorios y estar equipadas con extractores de aire al nivel del piso y del techo.
11. Las sustancias susceptibles de generar peróxidos (THF, éter, etc.) deberán ser verificadas periódicamente.
12. Para preparar soluciones, diluidas de ácido sulfúrico es recomendable:
  - a) Enfriar el recipiente que contenga agua en un baño de hielo;
  - b) Agregar el ácido al agua en porciones pequeñas, dejando que éste resbale por la pared del recipiente;
  - c) Agitar después de cada adición de ácido regresando el recipiente al baño de hielo.
13. Nunca vierta agua sobre ácido sulfúrico concentrado.
14. Los éteres (etilico, isopropílico, etc.), y el tetrahidrofurano, pueden explotar cuando se les destila o se les pone a refluir debido a la presencia de peróxidos. **Cuando sea necesario calentar estos solventes** se deberán poner en contacto con sales ferrosas o con sulfito de sodio y después pasarlos por una columna de alúmina básica activada. Tal tratamiento destruye los peróxidos. Se recomienda no usar muestras de éteres que hayan estado almacenadas por tiempo prolongado.
15. El éter etílico y el disulfuro de carbono son muy inflamables y nunca deben calentarse en parrilla eléctrica o en la flama del mechero, ni en presencia de fuentes de alto voltaje.
16. El agua oxigenada al 30% puede explotar al contacto con fierro, cobre, cromo o sales de estos metales. Evite ponerla en contacto con tales sustancias.
17. Los percloratos y peróxidos inorgánicos explotan cuando se les pone en contacto con sustancias orgánicas. Evite poner en contacto estos materiales.
18. Los percloratos y permanganatos explotan cuando se les pone en contacto con ácido sulfúrico. Evite el uso de estas sustancias en trenes de secado o de absorción de impurezas de gases.
19. Los nitrilos deberán manejarse en la campana de extracción y usando un respirador adecuado ya que poseen una alta toxicidad.
20. Existen sustancias como el diazometano y sus derivados que son muy tóxicas y de alta explosividad. Sin excepción alguna, este tipo de reactivos sólo podrán utilizarse bajo la vigilancia del personal académico responsable y observando las indicaciones de las normas oficiales vigentes y de las hojas de seguridad correspondientes.
21. Para la utilización de acrilamida se requiere del uso de guantes de hule con el objeto de evitar el contacto de la piel con esta sustancia ya que es cancerígena.
22. El sodio, el potasio y el calcio metálicos, nunca deberán colocarse en presencia de agua y deberán almacenarse en solventes tales como el benceno. Nunca deberán manejarse o disponerse el sodio, el potasio o el calcio metálico en presencia de agua; se recomienda que dichas sustancias se diluyan en solventes como el benceno o el nujol.
23. El manejo de soluciones de reactivos órgano-metálicos deberá hacerse en condiciones anhidras evitando el contacto directo con el agua.
24. En el manejo de catalizadores tales como el níquel raney no deberá permitirse que éste llegue a sequedad para evitar el peligro de combustión espontánea.
25. El retiro y la eliminación de desechos deberá hacerse de acuerdo con la NOM-052-SEMARNAT-2005 y con los procedimientos establecidos en la Unidad.

Además, cabe destacar que:

- a) El uso de la bata es obligatorio durante el desarrollo de las actividades experimentales, tanto para los docentes como para los alumnos.

- b) Los desechos generados no podrán ser eliminados sin contar con la autorización del profesor y deberá hacerse conforme lo establecido en el presente manual.
- c) Los desechos de materiales peligrosos deberán realizarse en envases propios para ello y ser entregados a los laboratoristas o en la coordinación de laboratorios.
- d) Los espacios deberán mantenerse libres de objetos que obstaculicen el adecuado desplazamiento de los usuarios del laboratorio por lo que las mochilas y demás objetos personales del alumno deberán colocarse bajo las mesas en los espacios destinados para ello.
- e) Tanto alumnos como docentes deberán ubicar durante la primera sesión de laboratorio, las salidas de emergencia, regaderas y extintores.
- f) El material destinado a contener materiales para su manejo y/o almacenamiento deberá ser siempre rotulado especificando su contenido, la UEA a la que pertenece, nombre de los responsables (alumnos y docentes) y la fecha, así como el tiempo de permanencia en caso de requerirse.
- g) Queda estrictamente prohibido fumar y consumir alimentos y bebidas al interior del laboratorio.

## NOTA

**Durante todas las prácticas y por seguridad.** Recordar que durante todo el proceso práctico se deberá usar bata cerrada con botonadura completa y lentes protectores. En ninguna de las sesiones del laboratorio se permitirá el uso de sandalias, ni tenis de tela. Se deberá traer el material recomendado como es franela, tijeras, cinta adhesiva, plumón permanente de punto fino y jabón líquido. Queda estrictamente prohibida la entrada si no se cumplen estos requisitos, esto aplica a personas ajenas al laboratorio, y también el uso de celulares salvo para tomar fotos.

Cada alumna y alumno debe llevar una bitácora de control, donde deberá tener anotado previamente los cálculos de cómo preparar las soluciones y demás requisitos que se te indiquen para evitar contratiempos.

**Al terminar todas las prácticas.** El lugar y el material de trabajo debe quedar limpio y ordenado, también se deben apagar y desenchufar los aparatos entregar el materia seco.

Lavarse las manos perfectamente para evitar intoxicaciones con algunos reactivos.  
Limpiar la tarja y ordenar los bancos.



## Práctica 1

### Determinación de la velocidad inicial ( $V_0$ ) de una reacción enzimática

#### Introducción

Las enzimas son proteínas que funcionan como biocatalizadores, es decir aceleran la velocidad ( $V$ ) a la cual se llevan a cabo las reacciones en las que intervienen.

Esta velocidad es el parámetro mediante el cual se evalúa la actividad de una enzima, y se expresa como el aumento en la concentración de producto obtenido o bien de sustrato consumido, en función del tiempo. Es importante conocer y estudiar los factores que influyen en la actividad enzimática, como lo son las concentraciones de la enzima y sus sustratos, el pH, la temperatura, la concentración de iones (fuerza iónica) y la posible presencia de inhibidores de la reacción. Si las condiciones de la reacción no son las adecuadas, la velocidad inicial ( $V_0$ ) de la reacción podría ser muy baja y obtenerse poco producto en un tiempo muy largo, incluso la enzima podría inactivarse. Por el contrario, si las condiciones son las óptimas para la enzima, la velocidad inicial será alta, obteniéndose una gran cantidad de producto en corto tiempo.

#### Objetivos

- Evaluar la reacción de una enzima hasta agotarse el sustrato presente.
- Determinar la  $V_0$  de la enzima en las condiciones de reacción utilizadas.

#### Material y equipo

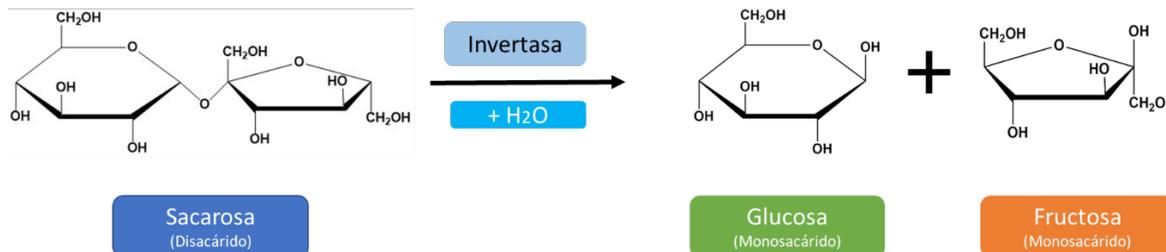
Material por equipo	Material por grupo
2 Celdas para espectrofotómetro	2 Matraces aforados de 100 mL
1 Mechero Fisher	2 Agitadores magnéticos
1 Cuatripié	2 Vasos de precipitados de 100 mL
1 Tela de asbesto	1 Parrilla eléctrica
1 Baño María de aros	1 Balanza analítica
1 Gradilla	1 Potenciómetro
1 Pipeta volumétrica de 1 mL	Agua destilada
8 Pipetas graduadas de 1 mL	Hielo
2 Pipetas graduadas de 10 mL	
2 Vasos de precipitados de 100 mL	
20 Tubos con tapón de rosca	
1 Jeringa	
1 Piseta con agua destilada	
1 Palangana	
1 Termómetro	
1 Espectrofotómetro	
1 Agitador vortex	
1 Baño de temperatura controlada	

## Reactivos

Soluciones	Reactivos
Solución amortiguadora para calibrar a pH 4	Sacarosa
Solución amortiguadora para calibrar a pH 7	Invertasa (46 U/mg)
Solución amortiguadora de acetatos (0.05 M, pH 4.5)	Acetato de sodio
Solución de DNS	Ácido acético

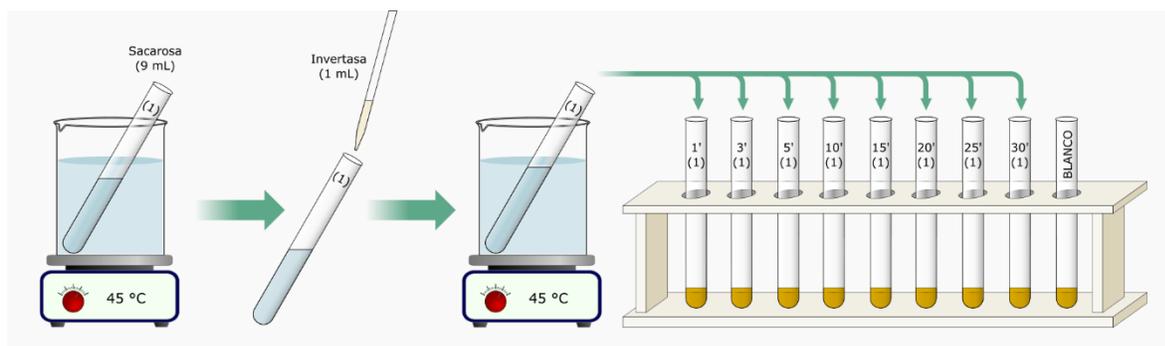
## Fundamento teórico

La enzima a utilizar es la invertasa, la cual hidroliza el enlace glucosídico de la sacarosa generando fructosa y glucosa. Además, como la sacarosa es un azúcar no reductor, la actividad enzimática de la invertasa se determinará midiendo el aumento de grupos reductores (glucosa y fructosa) empleando el método de ácido dinitrosalicílico (DNS).



## Procedimiento

1. Preparar una solución de enzima de 100 µg/mL en solución amortiguadora de acetatos (0.05 M, pH 4.5).
2. Preparar una solución al 2.5% (p/v) de sacarosa en la solución amortiguadora.
3. Colocar 9 mL de la solución de sacarosa en dos tubos de ensaye (1 y 2).
4. Colocar los tubos en un baño de temperatura controlada a 45 °C (por lo menos durante 10 min antes de empezar la reacción).
5. Preparar una serie de 8 tubos para cada tubo, marcados como sigue: 1'(1), 3'(1), 5'(1), 10'(1), 15'(1), 20'(1), 25'(1) y 30'(1) marcar de igual forma para el tubo 2 y marcar un tubo como "blanco", lo que hace un total de 17 tubos. Agregar 1 mL de la solución de DNS (ver Anexo 1) a cada uno de los 17 tubos.



## Reacción Enzimática

1. Agregar 1 mL de la solución de enzima al tubo número 1, registrando el tiempo exacto de la adición. Agitar. Regresar el tubo al baño de agua y esperar.

Tomar 1 mL de la mezcla de reacción de tal modo que, al minuto exacto de la adición de la enzima, sea vaciado al tubo con DNS marcado 1'(1). La reacción enzimática se detiene al entrar en contacto con el DNS, debido al pH básico de éste.

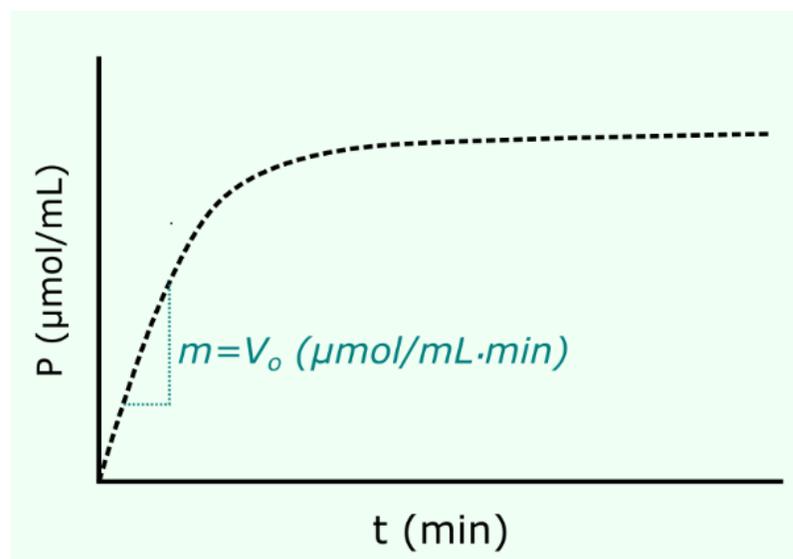
**Nota:** Es importante agitar antes de tomar la muestra y pipetear de forma adecuada a fin de evitar variaciones en los resultados. También debe agitarse vigorosamente al vaciar la muestra al tubo con DNS.

Tomar muestras a los 3, 5, 10, 15, 20, 25, y 30 minutos vaciando a los tubos marcados 3'(1), 5'(1), ..., respectivamente.

2. Hacer lo mismo para el tubo con sacarosa marcado como 2.
3. Una vez que se tienen los 16 tubos listos, agregar 1 mL de solución amortiguadora al tubo con DNS marcado "blanco".
4. Poner los 17 tubos a ebullición durante 5 minutos.
5. Enfriar en baño de hielo.
6. Agregar 10 mL de agua destilada agitar y dejar reposar 15 min.
7. Leer absorbancia a  $\lambda = 540 \text{ nm}$ , ajustando a cero con el tubo marcado como "blanco".

## Cálculos

1. Utilizando los valores de absorbancia, extrapolar de la curva patrón (ver Anexo 1) la concentración de azúcares reductores en cada tubo.
2. Graficar Producto vs. tiempo y observar los cambios en la concentración de producto respecto al tiempo.



3. Determinar la velocidad inicial ( $V_0$ ) para cada tubo, calculando la pendiente de la parte recta de la gráfica de Producto vs. tiempo.
4. Calcular el % de la sacarosa total que ha sido hidrolizado en cada tiempo.

5. Hacer una gráfica de % de sacarosa hidrolizada vs. tiempo.

## Cuestionario

1. ¿Qué es una enzima?
2. ¿Qué reacción cataliza la invertasa?
3. ¿De qué fuentes se puede obtener la invertasa?
4. ¿Qué es un azúcar no reductor?
5. ¿Cómo se va a determinar la concentración de azúcares reductores? Justifique su respuesta.
6. Explique el fundamento de la técnica de DNS
7. Explique de qué manera se puede medir la actividad de una enzima (proponga un experimento diferente al que vamos a realizar)
8. Explique qué es velocidad inicial.

## Referencias

- Duggleby, R. G. (1995). Analysis of enzyme progress curves by non-linear regression. *Methods in Enzymology*, 249:61-90.
- Iturbe, F. & Sandoval, J. (2011). *Análisis de alimentos. Fundamentos y técnicas*. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Química.
- Kennelly, P. J., & Rodwell V. W. (2013). Enzimas: cinética. En: Murray R.K., Bender D.A., Botham K.M., Kennelly P.J., Rodwell V.W., & Weil P. (Eds.), *Harper. Bioquímica ilustrada, 29a edición*. McGraw Hill.
- Lodeiro A. R. (2015). *Catálisis enzimática. Fundamentos químicos de la vida*. Argentina: Universidad de la Plata.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Appling, D. R. & Anthony-Cahill, S. J. (2013). *Bioquímica*. 4ª edición. España: Pearson.

## Práctica 2

### Influencia de la concentración de sustrato en la velocidad inicial de una reacción enzimática. Determinación de $K_M$ y $V_{max}$

#### Introducción

El efecto que ejerce la concentración de sustrato en las reacciones enzimáticas fue estudiado por los investigadores Leonor Michaelis y Maude Menten en 1913. Estableciendo que la reacción enzimática se desarrolla en dos etapas: durante la primera se forma un complejo enzima-sustrato, y en la segunda el complejo se rompe para formar el producto de la reacción y deja la enzima libre para que nuevamente pueda combinarse con otra molécula de sustrato. Lo anterior se expresa en la siguiente ecuación general, en donde se considera la participación de un sustrato:



El Modelo de Michaelis-Menten es válido bajo dos consideraciones: cuando la concentración de sustrato es mayor que la concentración de la enzima y cuando la reacción se encuentra en estado estacionario. Por lo que la ecuación de Michaelis-Menten describe la variación de la velocidad inicial de la reacción con respecto a la concentración de sustrato:

$$V_0 = V_{max} \frac{[Sustrato]}{K_M + [Sustrato]}$$

Para facilitar la determinación de  $K_M$  y  $V_{max}$  la ecuación de Michaelis-Menten se puede transformar mediante distintos métodos de linealización. Algunos de los más utilizados son los métodos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes y Augustinsson, en donde la ventaja que se obtiene es la fácil interpretación de  $K_M$  y  $V_{max}$ .

#### Objetivos

- Observar el efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de reacción de una enzima.
- Determinar la constante de Michaelis ( $K_M$ ) y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de la enzima, usando el modelo de Lineweaver-Burk.

## Material y equipo

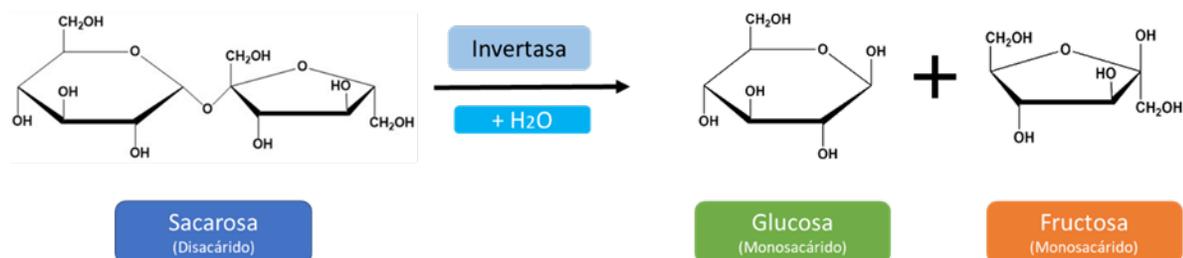
Material por equipo	Material por grupo
1 Espectrofotómetro	2 Matraces aforados de 100 mL
2 Celdas para espectrofotómetro	2 Agitadores magnéticos
1 Termómetro	2 Vasos de precipitados de 100 mL
1 Mechero	1 Parrilla eléctrica
1 Cuatripié	1 Balanza analítica
1 Tela de asbesto	Agua destilada
1 Baño María de aros	Hielo
1 Gradilla	
1 Pipeta volumétrica de 1 mL	
10 Pipetas graduadas de 1 mL	
2 Pipetas graduadas de 10 mL	
5 Vasos de precipitados de 100 mL	
22 Tubos con tapón de rosca	
1 Jeringa	
1 Agitador vortex	
1 Piseta con agua destilada	
1 Palangana	
1 Baño de temperatura controlada	

## Reactivos

Soluciones	Reactivos
Solución amortiguadora para calibrar a pH 4	Sacarosa
Solución amortiguadora para calibrar a pH 7	Invertasa (46 U/mg)
Solución amortiguadora de acetatos (0.05 M, pH 4.5)	Acetato de sodio
Solución de DNS	Ácido acético

## Fundamento teórico

La enzima a utilizar es la invertasa, la cual hidroliza el enlace glucosídico de la sacarosa generando fructosa y glucosa. Además, como la sacarosa es un azúcar no reductor, la actividad enzimática de la invertasa se determinará midiendo el aumento de grupos reductores (glucosa y fructosa) empleando el método de ácido dinitrosalicílico (DNS).



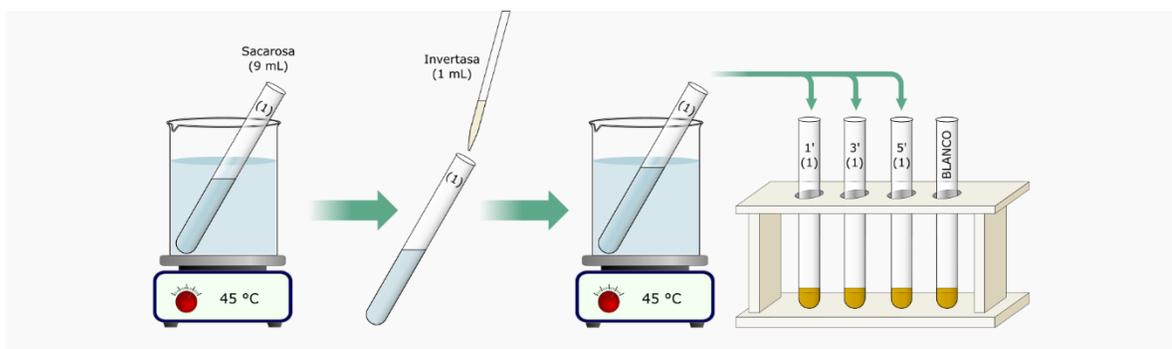
## Procedimiento

1. Preparar una solución de enzima de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en solución amortiguadora de acetatos (0.05 M, pH 4.5).
2. Preparar una solución al 15% (p/v) de sacarosa en la solución amortiguadora.
3. Preparar una serie de tubos como sigue:

Tubo	Solución de sacarosa (mL)	Solución amortiguadora (mL)
1	1	8
2	3	6
3	5	4
4	7	2
5	9	0

**Nota:** Cada tubo tiene una concentración de sacarosa diferente.

4. Colocar los tubos en un baño de temperatura controlada a 45 °C (por lo menos durante 10 min antes de empezar la reacción).
5. Preparar una serie de 3 tubos para cada concentración de sacarosa, marcados como sigue: 1'(1), 3'(1), 5'(1) respectivamente, hasta llegar a 1'(5), 3'(5) y 5'(5), lo que hace un total de 15 tubos.
6. Agregar 1 mL de la solución de DNS (ver Anexo 1) a cada uno de los 15 tubos.
7. Preparar de la misma manera un tubo adicional marcado "blanco".



## Reacción Enzimática

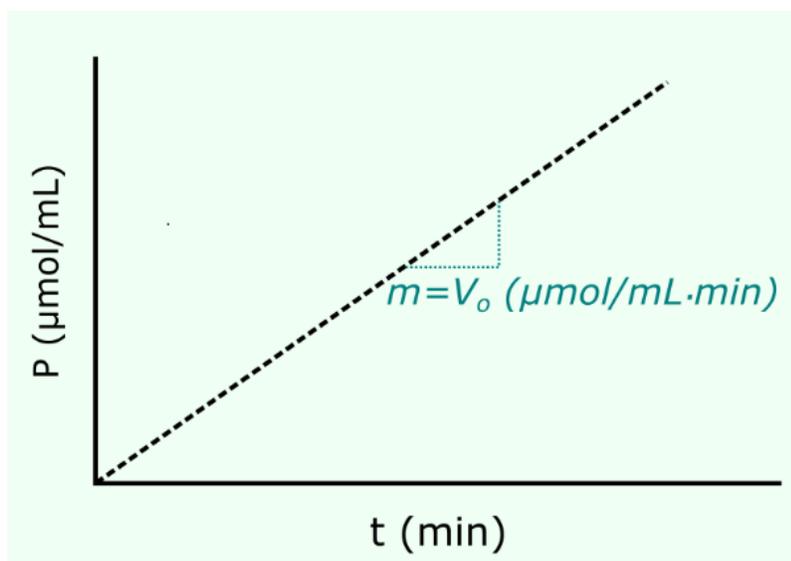
1. Agregar 1 mL de la solución de enzima al tubo número 1 (concentración más baja de sacarosa), registrando el tiempo exacto de la adición.
2. Agitar.
3. Regresar el tubo al baño de agua y esperar.
4. Tomar 1 mL de la mezcla de reacción de tal modo que, al minuto exacto de la adición de la enzima, sea vaciado al tubo con DNS marcado 1'(1). La reacción enzimática se detiene al entrar en contacto con el DNS.
5. Tomar muestras a los 3 y 5 minutos vaciando a los tubos marcados 3'(1) y 5'(1) respectivamente.

**Nota:** Es importante agitar antes de tomar la muestra y pipetear de forma adecuada a fin de evitar variaciones en los resultados. También debe agitarse vigorosamente al vaciar la muestra al tubo con DNS.

6. Hacer lo mismo para cada una de las concentraciones de sacarosa restantes.
7. Una vez que se tienen los 15 tubos listos, agregar 1 mL de solución amortiguadora al tubo con DNS marcado "blanco".
8. Poner los 16 tubos a ebullición durante 5 minutos.
9. Enfriar en baño de hielo.
10. Agregar 10 mL de agua destilada, agitar y dejar reposar 15 min.
11. Leer absorbancia a  $\lambda = 540$  nm, ajustando a cero con el tubo marcado como "blanco".

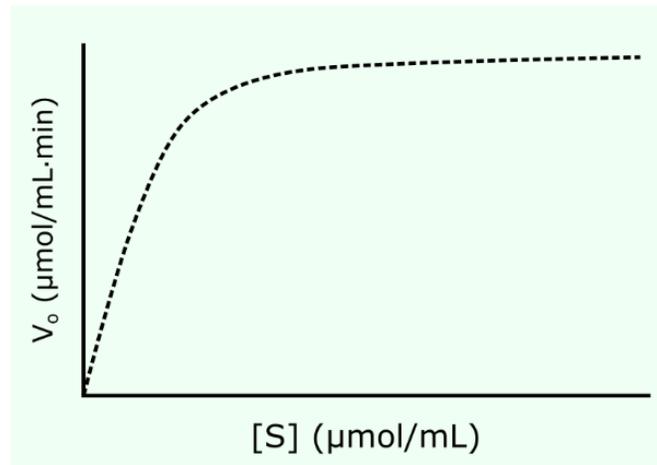
### Cálculos

1. Utilizando los valores de absorbancia, extrapolar de la curva patrón la concentración de reductores (ver Anexo 1) en cada tubo.
2. Determinar la velocidad inicial ( $V_o$ ) para cada concentración, sacando la pendiente de una gráfica de Producto vs. tiempo.

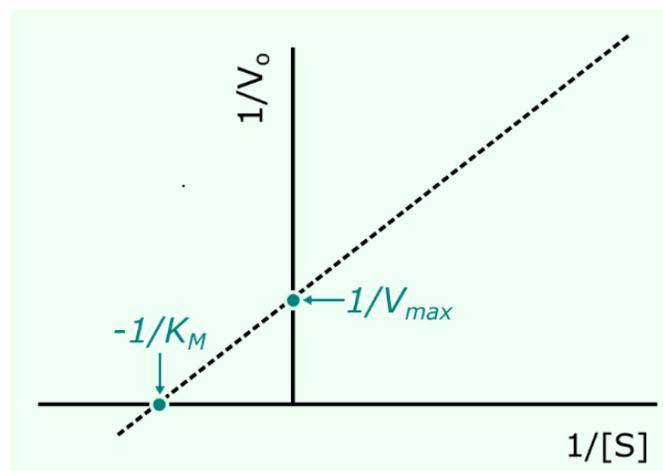


Concentración de sustrato	$V_o$

3. Graficar los resultados obtenidos,  $V_o$  vs.  $[S]$  (Michaelis-Menten).



4. Utilizando el método de Lineweaver-Burk (Graficar  $1/V_o$  vs.  $1/[S]$ ), obtener los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$ .



5. Hacer el cálculo de  $K_M$  y  $V_{max}$  utilizando los métodos de Augustinsson ( $Y=[S]/V_o$ ,  $X=[S]$ ); Eadie-Hofstee ( $Y=V_o$ ,  $X=V_o/[S]$ )

**Tabla de resultados**

Modelo	$V_{max}$	$K_M$

## Cuestionario

1. Explique y defina que es el  $K_M$ , cómo se relaciona con la afinidad de la enzima por el sustrato, y de qué manera varía entre los diferentes sustrato para una misma enzima.
2. Explique cómo se determina experimentalmente la velocidad máxima y defínala.
3. Explique cómo afecta la concentración del sustrato a la actividad enzimática.
4. Explique el modelo de Lineweaver-Burk.
5. Explique el modelo de Augustinsson.
6. Explique el modelo de Eadie-Hofstee
7. Explique el modelo de Hanes

## Referencias

- Badui Dergal, S. (2013). Química de los Alimentos. 5ª edición. México: Pearson.
- Lodeiro A. R. (2015). Catálisis enzimática. Fundamentos químicos de la vida. Ed. Universidad de la Plata. Argentina.
- López-Nicolás, J. M. & García-Carmona, F. (2015). Los cuatro mosqueteros de la cinética enzimática. Revista Eubacteria, 34:39-43
- Vigara Fernández, J. (2005). Enzimas II. España: Universidad de Huelva - Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
- Zúñiga Llanos, A, Ferrer Villena, C., Salazar Quispe, I., Naquiche Calero, A. & Castellanos Cabrera, R. (2019). Estudio cinético de la hidrólisis del almidón de *Solanum tuberosum*, *Ipomoea batatas* y *Manihot esculenta* con amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* BA-3 aislada de los géiseres de Candarave en Tacna. Ciencia & Desarrollo, 24:18-26. doi:10.33326/26176033.2019.24.781

## Práctica No. 3

### Efecto de la temperatura en la velocidad inicial de una reacción enzimática

#### Introducción

Como ocurre en muchas reacciones químicas, la velocidad de una reacción enzimática se incrementa al aumentar la temperatura, esto se debe a que al aumentar la temperatura aumenta la energía cinética de las moléculas, por lo que éstas se mueven más rápido, incrementando así las colisiones entre las enzimas y los sustratos por unidad de tiempo.

La ecuación de Arrhenius ( $\ln V_0 = \ln k - E_a/RT$ ) representa la fracción de las colisiones que tienen suficiente energía para superar la barrera de activación. La ecuación se puede usar para comprender cómo la velocidad de una reacción enzimática depende de la temperatura.

Un aumento de diez grados centígrados en la temperatura aumentará la actividad de la mayoría de las enzimas entre un 50% y un 100%. Variaciones en la temperatura de reacción tan pequeñas como 1 o 2 grados pueden introducir cambios del 10% al 20% en los resultados.

El aumento en la velocidad de la reacción sólo se produce hasta cierto límite, ya que, a altas temperaturas, la velocidad de la reacción enzimática comienza a disminuir hasta un punto en el que se pierde la estructura de la enzima, es decir, se desnatura, y una vez que esto ocurra, la enzima pierde por completo su actividad.

Como cada enzima es diferente en su estructura debido a la combinación de aminoácidos, la temperatura de trabajo más adecuada es específica para cada enzima. Por ejemplo, la mayoría de las determinaciones enzimáticas empleando enzimas animales, se realizan por debajo de 40 °C, debido a que muchas de ellas se desnaturalizan a esa temperatura. Por el contrario, las enzimas de algunas bacterias hipertermofílicas pueden trabajar adecuadamente a temperaturas entre 60 y 100 °C.

#### Objetivos

- Estudiar el efecto que tiene la temperatura de reacción en la velocidad de la enzima.
- Determinar la temperatura a la cual la enzima presenta mayor actividad.
- Determinar, mediante la ecuación de Arrhenius la energía de activación de la reacción enzimática, así como la energía de activación de la desnaturalización de la enzima.

#### Material y equipo

Material por equipo	Material por grupo
2 Celdas para espectrofotómetro	2 Matraces aforados de 100 mL
1 Mechero	2 Agitadores magnéticos
1 Cuatripié	2 Vasos de precipitados de 100 mL
1 Tela de asbesto	1 Parrilla eléctrica
1 Baño María de aros	1 Balanza analítica
1 Gradilla	Agua destilada
1 Pipeta volumétrica de 1 mL	Hielo
10 Pipetas graduadas de 1 mL	
4 Pipetas graduadas de 10 mL	
6 Vasos de precipitados de 100 mL	

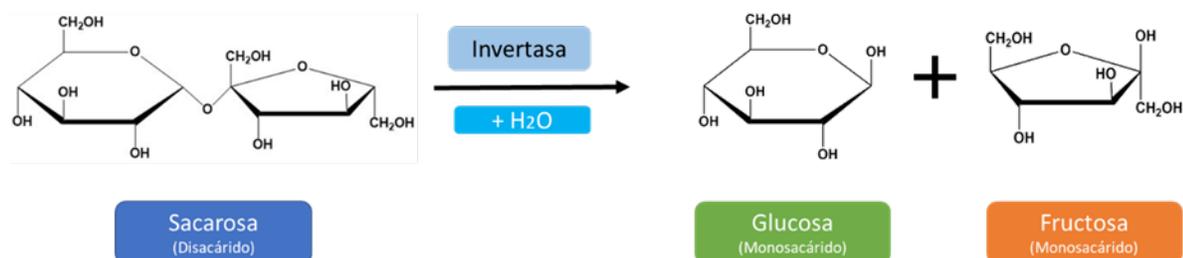
Material por equipo	Material por grupo
26 Tubos con tapón de rosca	
1 Jeringa	
1 Piseta con agua destilada	
1 Palangana	
1 Termómetro	
1 Espectrofotómetro	
1 Agitador vortex	
1 Baño de temperatura controlada	

## Reactivos

Soluciones	Reactivos
Solución amortiguadora para calibrar a pH 4	Sacarosa
Solución amortiguadora para calibrar a pH 7	Invertasa (46 U/mg)
Solución amortiguadora de acetatos (0.05 M, pH 4.5)	Acetato de sodio
Solución de DNS	Ácido acético

## Fundamento teórico

La enzima a utilizar es la invertasa, la cual hidroliza el enlace glucosídico de la sacarosa generando fructosa y glucosa. Además, como la sacarosa es un azúcar no reductor, la actividad enzimática de la invertasa se determinará midiendo el aumento de grupos reductores (glucosa y fructosa) empleando el método de ácido dinitrosalicílico (DNS).



## Procedimiento

1. Preparar una solución de enzima de 100 µg/mL en solución amortiguadora de acetatos (0.05 M, pH 4.5).
2. Preparar una solución al 15% de sacarosa en solución amortiguadora de acetatos 0.05 M, pH 4.5.
3. Preparar 6 tubos con 9 mL de solución de sacarosa, cada uno y colocarlos en un baño a la temperatura indicada (por lo menos durante 15 min antes de iniciar la reacción).

Tubo	Solución de sacarosa (mL)	Temperatura (°C)
1	9	20
2	9	35
3	9	45
4	9	55
5	9	65
6	9	75

4. Preparar una serie de 3 tubos para cada temperatura marcados como sigue:

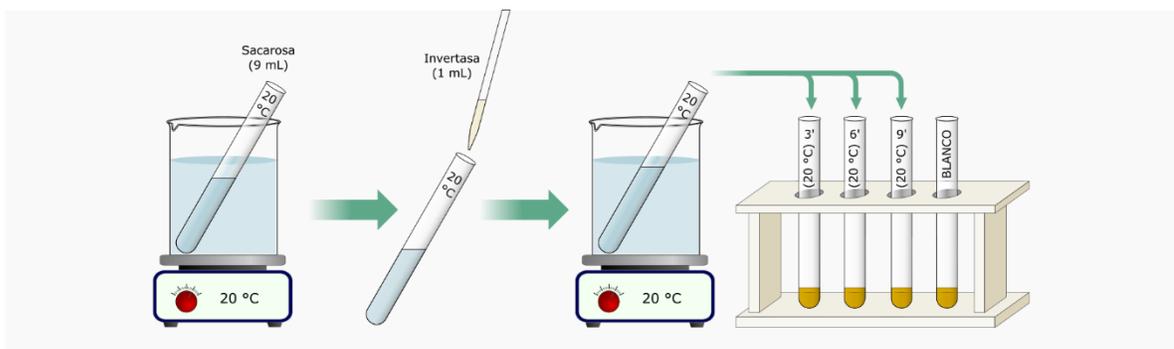
Para 20 °C y 75 °C: 3'(20 °C) 6'(20 °C) 9'(20 °C)

3'(75 °C) 6'(75 °C) 9'(75 °C)

Para el resto de las temperaturas: 1'(35 °C) 3'(35 °C) 5'(35 °C) ....

Hasta 1'(65 °C) 3'(65 °C) y 5'(65 °C)

5. Agregar 1 mL de la solución de DNS (ver Anexo 1) a cada uno de los 18 tubos. Preparar de la misma manera un tubo adicional marcado "blanco".



### Reacción enzimática

1. Agregar 1 mL de la solución de enzima al tubo 1 (20 °C) registrando el tiempo exacto de la adición y agitar. Regresar el tubo al baño de 20 °C y esperar.
2. Tomar 1 mL de la mezcla de reacción de tal modo que, a los 3 minutos exactos de la adición de la enzima, sea vaciado al tubo con DNS marcado con 3'(20 °C). La reacción enzimática se detiene al entrar en contacto con el DNS. Tomar muestras de 1 mL a los 6 y 9 minutos.

**Nota:** Es importante agitar antes de tomar la muestra y pipetear de forma adecuada con el fin de evitar variaciones en los resultados. También debe agitarse vigorosamente al vaciar la muestra al tubo con DNS.

3. Para el resto de las temperaturas excepto para 75 °C, las muestras deberán tomarse a los 1', 3' y 5'; mientras que para 75 °C a los 3', 6', y 9'.

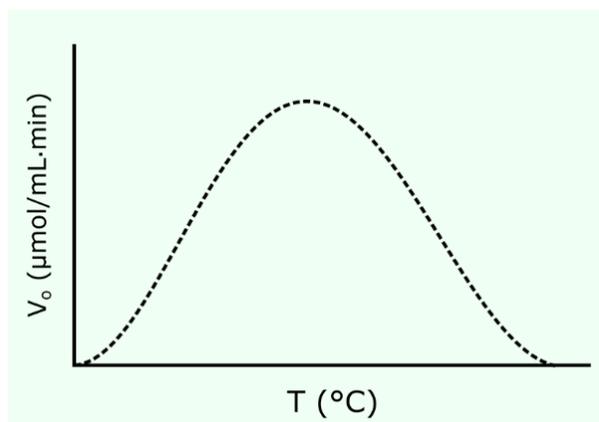
La diferencia en los tiempos a los cuales se muestra se debe a que en las temperaturas extremas se esperan velocidades de reacción más bajas.

4. Una vez que se tienen los 18 tubos listos, agregar 1 mL de solución amortiguadora al tubo marcado como blanco.
5. Poner a ebullición los 19 tubos durante 5 min.
6. Enfriar en baño de hielo.

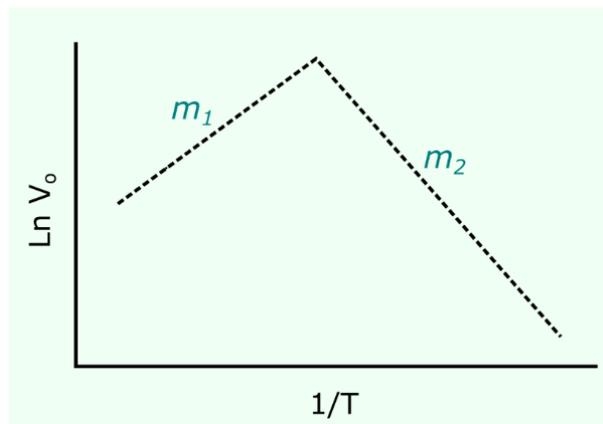
7. Agregar 10 mL de agua y dejar reposar 10 min.
8. Leer absorbancia a 540 nm, calibrando el aparato a cero con el tubo "blanco".

### Cálculos

1. Utilizando los valores de absorbancia, extrapolar de la curva patrón (ver Anexo 1) la concentración de azúcares reductores en cada tubo.
2. Determinar la velocidad inicial para cada temperatura, sacando la pendiente de las gráficas de producto vs. tiempo.
3. Graficar los resultados obtenidos en una gráfica de velocidad inicial vs. temperatura:



4. Calcular  $Q_{10}$
5. Utilizando la ecuación de Arrhenius, graficar  $\text{Ln } V_o$  vs.  $1/T$ . Calcular la  $E_a$  de la reacción enzimática y la  $E_a$  de la reacción de desnaturalización.



## Tabla de resultados

Temperatura	Velocidad inicial

## Cuestionario

1. ¿Cómo afecta la temperatura a las enzimas y a la actividad enzimática?
2. ¿Qué es la temperatura óptima de una enzima y cómo se determina experimentalmente?
3. ¿Qué es la energía de activación de una reacción enzimática?, ¿Y qué es la energía de desnaturalización de una enzima? ¿Para qué nos sirve conocerlas?
4. Defina el  $Q_{10}$ .

## Referencias

- Arcus, V. L., Prentice, E. J., Hobbs, J. K., Mulholland, A. J., Van der Kamp, M. W., Pudney, C. R., Parker, E. J. & Schipper, L. A. (2016). On the temperature dependence of enzyme-catalyzed rates. *Biochemistry*, *55*(12):1681-1688. doi:10.1021/acs.biochem.5b01094
- Bassetti, F. J., Bergamasco, R., Moraes, F. F. & Zanin, G.M. (2000). Thermal stability and deactivation energy of free and immobilized invertase. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *17*(4-7):867-872.
- Daniel, R. M., Danson, M. J., Eienthal, R., Lee, C. K. W. & Peterson, M. E. (2008). The effect of temperature on enzyme activity: New insights and their implications. *Extremophiles*, *12*(1):51-59. doi:10.1007/s00792-007-0089-7
- Peterson, M. E., Daniel, R. M., Danson, M. J., & Eienthal, R. (2007) The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. *The Biochemical Journal*, *402*(2):331–337. doi:10.1042/BJ20061143



## Práctica 4

### Efecto del pH en la velocidad inicial de una reacción enzimática

#### Introducción

Debido a que la mayoría de las enzimas son proteínas, éstas pueden sufrir cambios en su conformación por la presencia de los grupos químicos ionizables en las cadenas laterales de los aminoácidos. Dependiendo del pH en que se encuentre, éstos pueden tener carga eléctrica diferente. Por lo que cada enzima tendrá una conformación ideal para llevar a cabo la reacción enzimática a un pH determinado, el cual es conocido como el pH óptimo. Además, si hay cambios de pocas décimas de pH por encima o debajo del pH óptimo, la reacción enzimática será más lenta, y a valores de pH extremos se puede causar la desnaturalización de la enzima.

Además, el pH también puede afectar el estado de ionización del sustrato, del complejo enzima-sustrato y así modificar la velocidad de la reacción enzimática. Por lo que resulta importante mantener el pH estable durante la reacción, lo cual se puede hacer empleando soluciones amortiguadoras.

El perfil de actividad con respecto al pH puede ser diferente para cada tipo de enzima. En general la curva típica tiene forma de campana, siendo el punto máximo el valor de pH óptimo. Además, la relación entre el pH y la actividad enzimática depende del comportamiento ácido-base de la enzima y del propio sustrato.

#### Objetivos

- Observar el efecto del pH en la velocidad de la reacción enzimática.
- Determinar el pH al cual la enzima presenta mayor actividad (pH óptimo).

#### Material y equipo

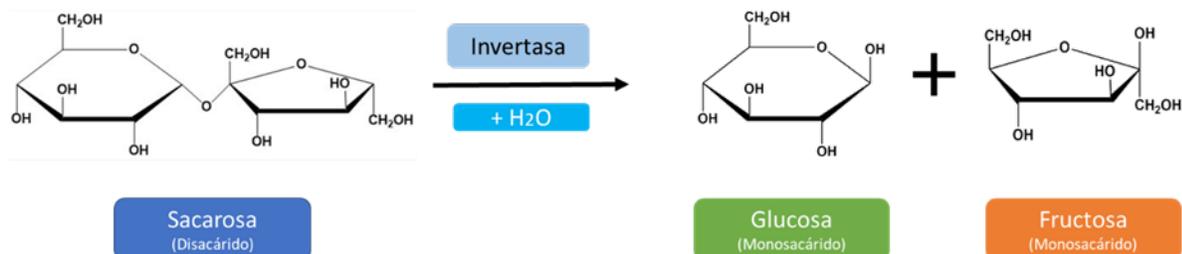
Material por equipo	Material por grupo
1 Espectrofotómetro	2 Matraces aforados de 100 mL
2 Celdas para espectrofotómetro	2 Agitadores magnéticos
1 Termómetro	2 Vasos de precipitados de 100 mL
1 Mechero	1 Parrilla eléctrica
1 Cuatripié	1 Balanza analítica
1 Tela de asbesto	Agua destilada
1 Baño María de aros	Hielo
1 Gradilla	
1 Pipeta volumétrica de 1 mL	
10 Pipetas graduadas de 1 mL	
6 Pipetas graduadas de 10 mL	
5 Vasos de precipitados de 100 mL	
26 Tubos con tapón de rosca	
1 Vaso de precipitados de 1000 mL	
1 Jeringa	
1 Agitador vortex	
1 Piseta con agua destilada	
1 Palangana	
1 Baño de temperatura controlada	

## Reactivos

Soluciones	Reactivos
Solución amortiguadora para calibrar a pH 4	Sacarosa
Solución amortiguadora para calibrar a pH 7	Invertasa (46 U/mg)
Soluciones amortiguadoras de citratos (0.01 M) a diferente pH: 3, 4, 4.5, 5.5, 6.5 y 7.5	Citrato de sodio
Solución de DNS	Ácido cítrico

## Fundamento teórico

La enzima a utilizar es la invertasa, la cual hidroliza el enlace glucosídico de la sacarosa generando fructosa y glucosa. Además, como la sacarosa es un azúcar no reductor, la actividad enzimática de la invertasa se determinará midiendo el aumento de grupos reductores (glucosa y fructosa) empleando el método de ácido dinitrosalicílico (DNS).



## Procedimiento

1. Preparar por lo menos 200 mL de una solución amortiguadora de citratos 0.01 M del pH designado. Cada equipo preparará una solución con un pH diferente: 3.0, 4.0, 4.5, 5.5, 6.5, y 7.5.
2. Preparar una solución de enzima de 100 µg/mL en solución amortiguadora de citratos pH 4.5.
3. Cada equipo debe preparar 100 mL de solución de sacarosa al 15% en la solución amortiguadora del pH que le fue designado.
4. Preparar 6 tubos con 9 mL de solución de sacarosa de cada uno de los pH's.

Tubo	Solución de sacarosa (mL)	pH
1	9	3.0
2	9	4.0
3	9	4.5
4	9	5.5
5	9	6.5
6	9	7.5

5. Colocar los 6 tubos en un baño de temperatura controlada (45 °C) por lo menos durante 15 min antes de iniciar la reacción enzimática.

- Preparar una serie de 3 tubos para cada pH marcados como sigue:

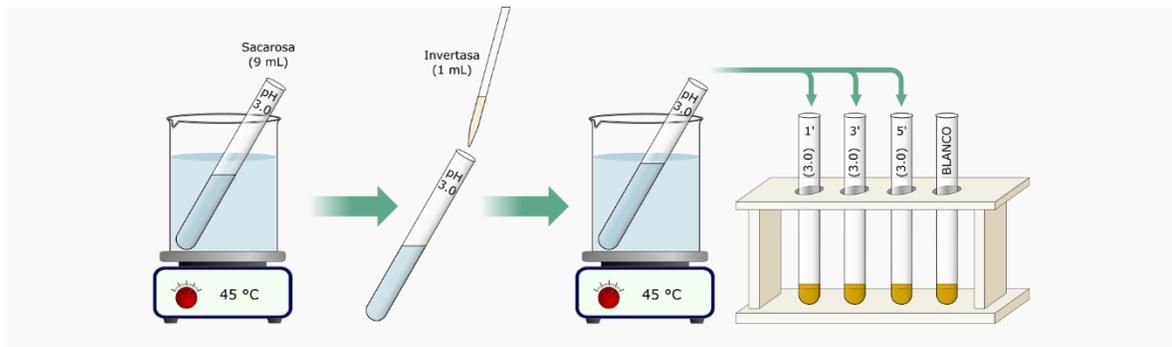
pH 3.0 y 7.5:      3'(3.0) 6'(3.0) 9'(3.0)

                         3'(7.5) 6'(7.5) 9'(7.5)

Resto de los pH's    1'(4.0) 3'(4.0) 5'(4.0),.....

hasta                    1'(6.5) 3'(6.5) 5'(6.5)

- Agregar 1 mL de la solución de DNS (ver Anexo 1) a cada uno de los 10 tubos. Preparar de la misma manera un tubo adicional marcado "blanco".

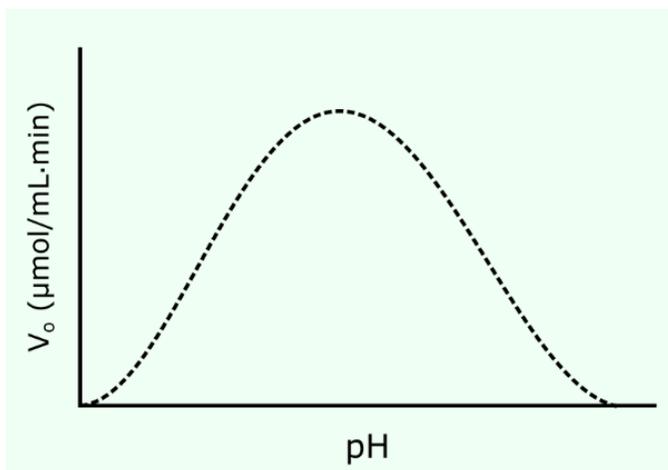


## Reacción enzimática

- Agregar 1 mL de la solución de enzima al tubo 1 (pH 3.0) registrando el tiempo exacto de la adición y agitar. Regresar el tubo al baño y esperar.
- Tomar 1 mL de la mezcla de reacción de tal modo que, a los 3 minutos exactos de la adición de la enzima, sea vaciado al tubo con DNS marcado 3'(3.0). Tomar muestras a los 6 y 9 min.
- Para el resto de los pH's, excepto para el pH 7.5, las muestras deberán tomarse a los 1, 3 y 5 minutos, mientras que para el de 7.5 a los 3, 6 y 9 min. La diferencia en los tiempos a los cuales se muestrea se debe a que en los pH's extremos esperamos velocidades de reacción más bajas.
- Una vez que se tienen los 18 tubos listos, agregar 1 mL de la solución de sacarosa a pH 4.5 al tubo marcado "blanco".
- Poner a ebullición los 19 tubos durante 5 min.
- Enfriar en un baño de hielo.
- Agregar 10 mL de agua y dejar reposar 10 min.
- Leer la absorbancia a  $\lambda = 540 \text{ nm}$ , calibrando el aparato a cero con el tubo "blanco".

## Cálculos

- Utilizando los valores de absorbancia extrapolar de la curva patrón la concentración de reductores (ver Anexo 1) para cada tubo.
- Determinar la velocidad inicial para cada pH sacando la pendiente de la gráfica de producto vs. tiempo.
- Graficar los resultados obtenidos en una gráfica de velocidad inicial vs. pH.



4. Determinar el pH al cual se observa la mayor actividad y elaborar una gráfica de actividad relativa (AR) vs. pH.

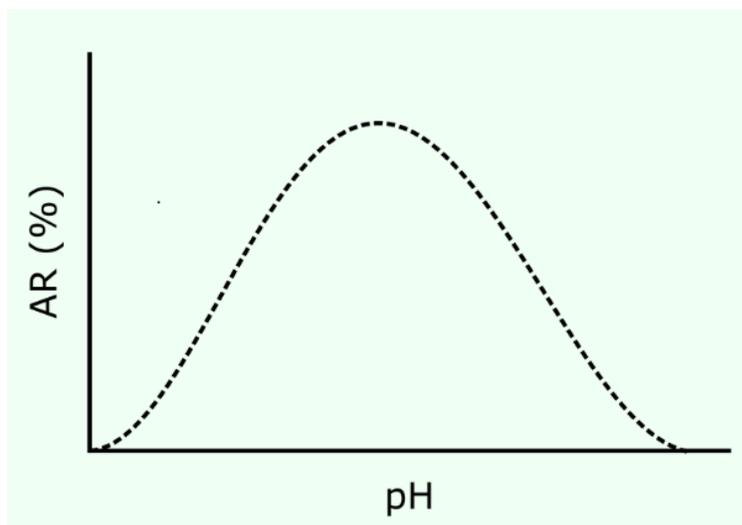


Tabla de resultados

pH	$V_o$	Actividad Residual

## Cuestionario

1. ¿Cómo afecta el pH a las enzimas y a la actividad enzimática?
2. ¿Qué es el pH óptimo de una enzima?
3. ¿Afecta de alguna manera el pH del medio al sustrato de la enzima?
4. ¿Cuál es el pH óptimo de la invertasa?
5. ¿Cómo se puede regular el pH de las enzimas en el laboratorio?

## Referencias

- Aponte, L. (2003). Actividad de las enzimas pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y celulasa durante la maduración de frutos de parchita maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). *Revista de la Facultad de Agronomía; Universidad Nacional de La Plata (Maracay)*, 29:145-160.
- Bisswanger, H. (2017). pH and Temperature Dependence of Enzymes. En: H. Bisswanger (Ed.), *Enzyme Kinetics*. EUA: John Wiley and Sons Inc. \_
- Hamed, M., Nashmin, F.H., Massoud, S., Mohammad, T., Hamideh, R. & Fatemeh, N. (2020) A review on invertase: Its potentials and applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25:101599.
- Tena Aldave, M. & Jorrín Novo, J. V. (2008). Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería. *Revista VirtualPRO*. Consultado en línea en la Biblioteca Digital de Bogotá.



## Práctica 5

### Inmovilización de enzimas

#### Introducción

En una reacción enzimática, muchas veces se incorpora la enzima en forma líquida, es decir, diluida en una solución amortiguadora. Dependiendo de las condiciones de la reacción y de las características de la enzima, la estabilidad estructural de esta última puede verse afectada, reduciendo su actividad; además, las enzimas adicionadas en solución no se pueden recuperar para un uso posterior; es decir, tienen un bajo factor de reutilización. Estos motivos pueden limitar la aplicación de algunas enzimas particularmente si éstas son costosas. Para superar estas limitaciones, puede recurrirse a la inmovilización de enzimas, la cual consiste en la retención de una enzima en un soporte o matriz, que le permita interactuar con los sustratos y conservar su función catalítica, sin encontrarse soluble en el medio de reacción. En comparación con las enzimas libres en solución, las enzimas inmovilizadas son más robustas y resistentes a los cambios ambientales y permite una fácil recuperación y reutilización de las enzimas. Además, permiten también diseñar reactores enzimáticos para poder realizar procesos en continuo los cuales pueden emplearse por largos periodos. Sin embargo, la inmovilización de enzimas también tiene desventajas como: la alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte, y la pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización.

#### Objetivos

- Conocer uno de los métodos de inmovilización de enzimas.
- Comprender algunas de las ventajas de la inmovilización enzimática.

#### Material y equipo

Material por equipo	Material por grupo
2 Celdas para espectrofotómetro	2 Matraces aforados de 100 mL
1 Mechero	2 Agitadores magnéticos
1 Cuatripié	2 Vasos de precipitados de 100 mL
1 Tela de asbesto	1 Parrilla eléctrica
1 Baño María de aros	
1 Gradilla	
1 Pipeta volumétrica de 1 mL	
10 Pipetas graduadas de 1 mL	
4 Pipetas graduadas de 10 mL	
6 Vasos de precipitados de 100 mL	
26 Tubos con tapón de rosca	
1 Espectrofotómetro	
1 Agitador vortex	
1 Baño de temperatura controlada	
1 Jeringa	

## Reactivos

Soluciones	Reactivos
Solución amortiguadora para calibrar a pH 4	Sacarosa
Solución amortiguadora para calibrar a pH 7	Invertasa (46 U/mg)
Solución amortiguadora de acetatos (0.05 M, pH 4.5)	Acetato de sodio
Solución amortiguadora de citratos (0.01 M, pH 4.5)	Ácido acético
Solución de DNS	Cloruro de calcio
	Alginato de sodio

## Fundamento teórico

Se ensayará un método de atrapamiento en gel de alginatos. La cual consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores del gel de alginato. El cual se formará al entrar en contacto el alginato de sodio con la solución de cloruro de calcio. La enzima por utilizar es la invertasa, la cual hidroliza el enlace glucosídico de la sacarosa generando fructosa y glucosa. Además, como la sacarosa es un azúcar no reductor, la actividad enzimática de la invertasa se determinará midiendo el aumento de grupos reductores (glucosa y fructosa) empleando el método de ácido dinitrosalicílico (DNS).

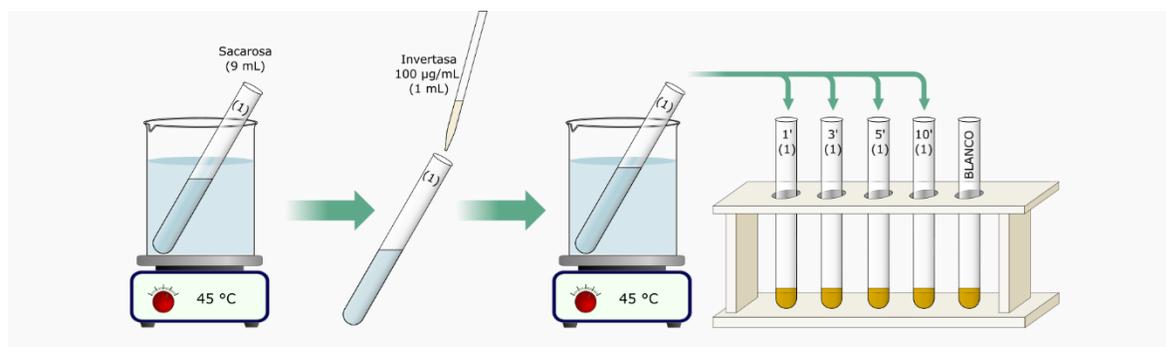
## Procedimiento

1. Preparar una solución amortiguadora 0.01 M de citratos pH 4.5 (250 mL por grupo)
2. Preparar 500 mL por equipo de una solución amortiguadora de acetatos 0.05 M pH 4.5.
3. Preparar 250 mL por equipo de una solución de sacarosa al 15% en solución amortiguadora de acetatos.
4. Preparar 250 mL por equipo de una solución 0.1 M de cloruro de calcio en agua.

## Determinación de actividad de la preparación enzimática

1. Preparar una solución de enzima de 100 µg/mL en solución amortiguadora de acetatos (0.05 M, pH 4.5).
2. Preparar 2 tubos con 9 mL de solución de sacarosa y ponerlos en un baño de temperatura controlada a 45 °C.
3. Preparar 8 tubos con 1 mL de la solución de DNS (ver Anexo 1) cada uno.
4. Adicionar 1 mL de la enzima a uno de los tubos de sacarosa y tomar muestras de 1 mL de la mezcla de reacción a los 1, 3, 5 y 10 min vaciándolas a los tubos de DNS correspondientes.

Hacer lo mismo con una solución de enzima 10 veces menor que la anterior.

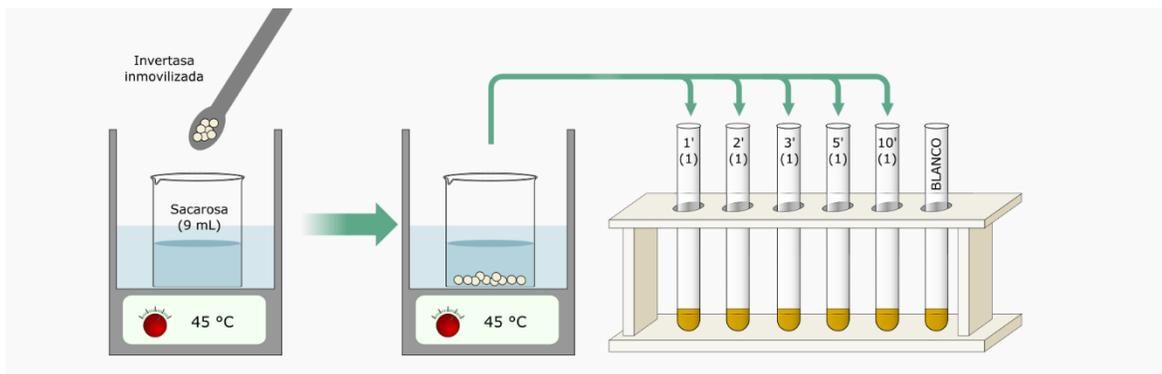


## Preparación del gel

1. Preparar una solución de enzima de 400 mg/mL en solución amortiguadora de citratos (0.01 M, pH 4.5).
2. Tomar 10 mL de solución de enzima y agregar 0.2 g de alginato de sodio. Agitar hasta formar un gel suave.
3. Pasar la suspensión de alginatos y enzima a una jeringa de plástico y dejarla caer gota a gota en la solución de cloruro de calcio (0.1 M), que debe estar continua pero suavemente agitada mediante un agitador magnético.
4. Dejar las esferitas formadas en la solución de cloruro de calcio con agitación suave durante 15 min.
5. Decantar las esferas y, con ayuda de una manta de cielo, enjuagarlas con agua destilada (se debe evitar que se sequen).
6. Vaciarlas a un vaso de precipitados con 50 mL de solución amortiguadora de acetatos para mantenerlas húmedas.

## Reacción enzimática

1. Preparar 10 tubos con 1 mL de solución de DNS (ver Anexo 1) marcados de la siguiente manera: 1'(1), 2'(1), 3'(1), 5'(1), 10'(1), 1'(2), 2'(2), 3'(2), 5'(2), y 10'(2). Preparar un tubo adicional marcado "blanco".
2. Poner un vaso de precipitados con 100 mL de la solución de sacarosa en un baño a 45 °C durante 30 min o hasta que la solución tome la temperatura del baño.
3. Vaciar las esferas a la solución de sacarosa, registrando el tiempo exacto de la adición (la solución debe estar en continua agitación). Tomar muestras de 1 mL de la solución a los 1, 2, 3, 5 y 10 min. Cada muestra deberá ser vaciada al tubo correspondiente de DNS al tiempo exacto indicado en cada tubo.
4. Decantar las esferas y enjuagarlas con agua destilada. Vaciarlas nuevamente a la solución amortiguadora de acetatos.
5. Repetir la reacción enzimática de la misma manera que se hizo anteriormente.
6. Poner los tubos con DNS y muestra en un baño a ebullición durante 5 min.
7. Enfriar en baño de hielo.
8. Agregar 10 mL de agua y dejar reposar durante 10 min.
9. Leer la absorbancia a  $\lambda = 540 \text{ nm}$  calibrando el aparato a cero con el tubo "blanco".
10. Decantar las esferas, escurrirlas en la manta y pesarlas.



## Cálculos

1. Calcular la actividad de la enzima en UE/g de enzima
2. Obtener las UE/g de catalizador
3. Calcular el rendimiento de la inmovilización (%).

## Cuestionario

1. ¿Qué es la inmovilización de enzimas?
2. ¿Cuántos métodos de inmovilización de enzimas se conocen? (Analiza más detalladamente el que se desarrollará en la práctica)
3. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de la inmovilización?
4. Menciona tres procesos en el área de alimentos donde se utilicen enzimas inmovilizadas, en cada caso menciona el nombre de la enzima y el método de inmovilización empleado.

## Referencias

- Aviles Cabral, H., Dorantes Adame, J. J., Calva Neria, G., Lucho Constantino, C. A., & Beltrán Hernández, R. I. (2018). Inmovilización de enzimas. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas E Ingenierías del ICBI*, 5(10):7-8.
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology*, 6:185-205. doi:10.1007/s12154-013-0102-9
- Lupo, P. B., González, A. C. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3:131-151.
- Sirisha, V.L. & Jain, A. (2016). Enzyme Immobilization: An overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *Advances in Food and Nutrition Research*, 79:179-211. doi:10.1016/bs.afnr.2016.07.004

## Práctica 6

### Clarificación de jugo de manzana

#### Introducción

En el proceso de elaboración de jugos de frutas, los tejidos de éstas se desintegran, y las pectinas que se encuentran en la pared celular se liberan. Dichas moléculas son polisacáridos que contribuyen a la turbidez y viscosidad de los jugos. Sin embargo, en jugos como el de la manzana es necesario eliminar las pectinas, dado que los consumidores prefieren consumir un jugo traslúcido y cristalino. Para obtener un producto con las características mencionadas es necesario realizar una clarificación, la cual puede ser llevada a cabo mediante la adición de un grupo de enzimas llamadas pectinasas.

En los extractos comerciales de pectinasas, coexisten tres enzimas: la pectinesterasa, la poligalacturonasa y la pectinliasa. Se sabe que la calidad sensorial de los jugos clarificados con pectinasas mejora, dado que se disminuye la turbidez y se favorece la precipitación de productos no deseados. Este fenómeno sucede debido a las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo por la presencia y actividad de las pectinasas. La pectinesterasa desesterifica la pectina liberando metanol y disminuye el grado de metilación de la pectina, por su parte la poligalacturonasa hidroliza los enlaces glucosídicos cercanos a un grupo carboxilo libre y la pectinliasa rompe los enlaces glucosídicos cercanos a un grupo metil-éster.

#### Objetivos

- Observar y conocer el proceso de clarificación del jugo de manzana mediante la adición de pectinasa.

#### Material y equipo

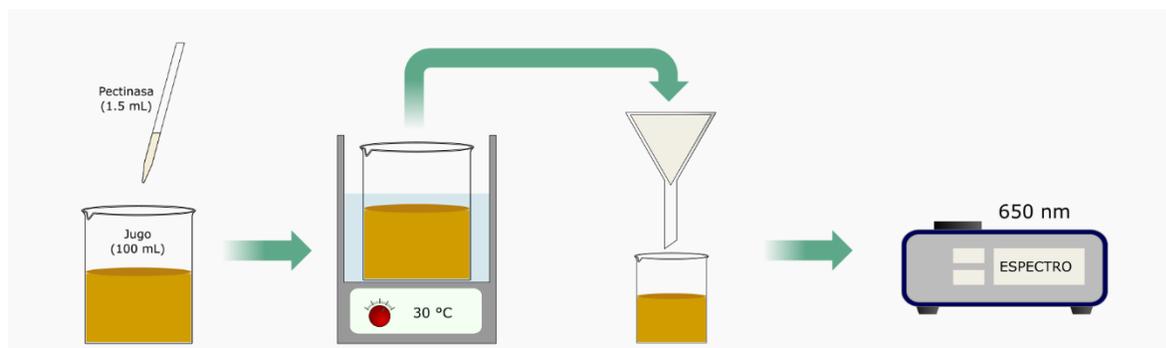
Material por equipo	Material por grupo
1 Espectrofotómetro	1 Matraz aforado de 50 mL
2 Celdas para espectrofotómetro	1 Agitador magnético
1 Termómetro	1 Vaso de precipitados de 100 mL
4 Vasos de precipitados de 250 mL	1 Parrilla eléctrica
1 Vasos de precipitados de 1000 mL	1 Balanza analítica
1 Gradilla	1 Espátula
3 Pipetas graduadas de 10 mL	1 Bomba de vacío
1 Jeringa	Agua destilada
1 Matraz Kitasato 250 mL	Gasa
1 Embudo Büchner	Papel filtro
1 Trampa de vacío	
1 Piseta con agua destilada	
1 Palangana	
1 Baño de temperatura controlada	
1 Extractor de jugo	

#### Reactivos

Pectinasa (10 U/g)

## Procedimiento

1. Preparar 50 mL de una solución de pectinasa comercial en agua (500 mg/100 mL).
2. Preparar 400 mL de jugo de manzana colado a través de una manta de cielo.
3. Poner 4 vasos con 100 mL de jugo, cada uno en un baño a 30 °C hasta que tomen la temperatura del baño.
4. Agregar a 3 de ellos 1.5 mL de la solución de enzima y 1.5 mL de agua al restante.
5. Poner los vasos nuevamente en el baño.
6. Filtrar el jugo de cada vaso a través de papel filtro grueso (No. 4, 41, 541) a intervalos de media hora, es decir, el primero a los 30 min de la adición de enzima, el segundo a los 60 min y el tercero a los 90 min. El vaso control puede ser filtrado al mismo tiempo que el último.
7. Medir la absorbancia de los 4 jugos a  $\lambda = 650 \text{ nm}$  y comparar los resultados con la absorbancia de un jugo comercial.



## Cálculos

Utilizando los valores de absorbancia, hacer una tabla de resultados obtenidos a cada tiempo de clarificación y comparar con un jugo comercial.

## Cuestionario

1. ¿Qué es la clarificación?
2. ¿Cuáles son los objetivos de la clarificación?
3. Explique brevemente cuántos tipos de clarificación se conocen
4. Menciona las características de la pectinasa y explica por qué se usa en la clarificación.

## Referencias

- Badui Dergal, S. (2013). *Química de los Alimentos*. 5ª edición. México: Pearson.
- García-Garibay, M. Ramírez, R. Q., & Canales, A. L. M. (2004). *Biología Alimentaria*. 1ª edición. México: Editorial Limusa.
- Martínez, K., Cazorla, A., Escobar, J. & Alvarado, C. (2017). Preparación de un jugo clarificado de frutas utilizando un concentrado enzimático de guayaba y papaya. *Ingeniería y Sociedad UC*, 12(1):8-22.
- Sandri, I. G., Fontana, R. C., Barfknecht, D. M., & da Silveira, M. M. (2011). Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10):2217-2222. doi:10.1016/j.lwt.2011.02.008
- Whitaker, J. (1994). *Principles of enzymology for the food sciences*. 2a edición. EUA: Marcel Dekker. Inc.

## Práctica 7

### Producción de enzimas

#### Introducción

Las enzimas son producidas comercialmente por microorganismos mediante fermentación sumergida o por fermentación en estado sólido.

Las enzimas industriales son producidas por microorganismos con estatus GRAS (generally recognized as safe - generalmente reconocidos como seguros) en grandes reactores biológicos llamados fermentadores. Sin embargo, algunas enzimas se siguen extrayendo de tejidos animales o vegetales. Las enzimas comerciales derivadas de plantas incluyen las enzimas proteolíticas papaína, bromelina y ficina, y algunas otras enzimas especiales, como la lipoxigenasa de la soya.

Las enzimas derivadas de animales incluyen proteinasas como la pepsina y el cuajo animal. Por lo general, el organismo productor de la enzima y a menudo también la enzima misma, han sido modificados genéticamente para obtener la máxima productividad y las propiedades enzimáticas deseadas. Una vez producida la enzima, ésta deberá purificarse.

#### Objetivo

- Producir poligalacturonasa y lactasa mediante fermentación con *Kluyveromyces marxianus*.

#### Material y equipo

Material por equipo	Material por grupo
1 Matraz Erlenmeyer de 250 mL	1 Incubadora
1 Asa de cultivo	1 Agitador orbital para matraces de 250 mL
1 Espátula	
1 Probeta 500 mL	Gasa
1 Piseta	Algodón
2 Mecheros	Centrifuga
4 Celdas para espectrofotómetro	Autoclave
1 Espectrofotómetro	
1 Baño de temperatura controlada	
1 Mechero Fisher	
1 Cuatripié	
1 Tela de asbesto	
1 Baño María de aros	
1 Gradilla	
1 Pipeta volumétrica de 1 mL	
8 Pipetas graduadas de 1 mL	
2 Pipetas graduadas de 10 mL	
2 Vasos de precipitados de 100 mL	
10 Tubos con tapón de rosca	
2 Tubos de centrifuga de 15 mL	
1 Jeringa	
1 Piseta con agua destilada	
1 Palangana	
1 Agitador vortex	

## Reactivos

Soluciones	Reactivos
Solución amortiguadora para calibrar a pH 4	Lactosa
Solución amortiguadora para calibrar a pH 7	Extracto de levadura
Solución amortiguadora de acetatos (0.05 M, pH 4.5)	Sulfato de amonio
Solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 6.6)	Fosfato de potasio
Solución de DNS	Sulfato de magnesio
	Pectina
	Ácido poligalacturónico
	Orto-nitrofenil-galactosa (ONPG)
	Acetato de sodio
	Ácido acético
	Alcohol isoamílico
	Gasa
	Algodón

## Procedimiento

### Producción de enzimas

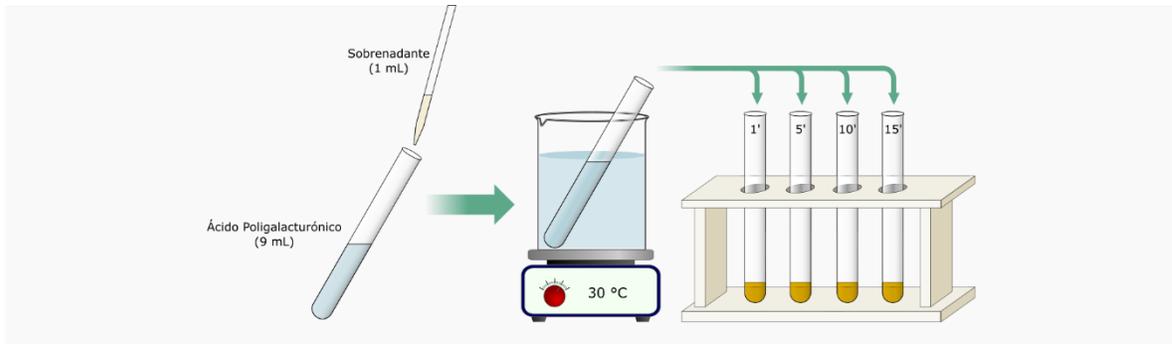
1. Preparar 50 mL de medio de cultivo para producir las enzimas, con la siguiente composición: 2% de lactosa, 0.25% de extracto de levadura, 0.1% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.05% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05% de  $\text{MgSO}_4$  en agua destilada y 0.5% de pectina.
2. Colocar el medio en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapón de algodón.
3. Esterilizar 15 minutos a 121 °C.
4. Inocular con dos asadas del cultivo de *Kluyveromyces marxianus*.
5. Incubar a 30 °C durante 48 horas con agitación a 100 rpm.
6. Centrifugar el caldo de la fermentación a 3500 rpm durante 20 minutos.
7. Recuperar el sobrenadante y el botón del centrifugado por separado.
8. Determinar la actividad de lactasa en las células y la actividad de pectinasa en el sobrenadante.

### Determinación de la actividad de lactasa

1. Se mezcla un volumen de 5 mL de las células re-suspendidas con 5 mL de alcohol isoamílico.
2. Aforar a 25 mL con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.6.
3. Incubar a 30 °C durante 1 hora con agitación orbital.
4. Separar las células y el alcohol en un embudo de separación: se desecha el alcohol y la fase acuosa se utiliza como extracto enzimático.
5. Tomar 0.1 mL de extracto enzimático y adicionar 2.7 mL de solución amortiguadora de fosfatos y 0.1 mL de solución 0.068 M (100 mg/mL) de ONPG.
6. Incubar a 37 °C, tomando lecturas de absorbancia a 410 nm a 2, 4, 6, 8, y 10 min en un espectrofotómetro.
7. Interpolares las absorbancias obtenidas en la curva patrón de ONP (ver Anexo 1) con un intervalo de concentraciones de 0.026 a 0.809  $\mu\text{mol/mL}$ .

### Determinación de la actividad de poligalacturonasa

1. Tomar 1 mL del sobrenadante y mezclar con 9 mL de solución de ácido poligalacturónico al 0.1% (preparado en solución amortiguadora de acetatos 0.05 M. pH 4.5).
2. Incubar a 30 °C, tomando alícuotas a 1, 5, 10 y 15 minutos.
3. Se determina la actividad por el método de DNS, leyendo la absorbancia a 540 nm.
4. Interpolar las absorbancias obtenidas en la curva patrón de azúcares reductores..



### Cuestionario

1. ¿Cómo se producen las enzimas a nivel industrial?
2. ¿Cuál es la reacción que cataliza la poligalacturonasa? Mencione sustrato, especificidad y condiciones.
3. ¿Cuál es la reacción catalizada por la lactasa? Mencione sustrato, especificidad y condiciones.
4. ¿Por qué se determina la actividad enzimática de estas enzimas con el método de DNS?

### Referencias

- Bansal, S., Oberoi, H. S., Dhillon, G. S., & Patil, R. T. (2008). Production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on  $\beta$ -galactosidase activity. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3):337–341. doi:10.1007/s12088-008-0019-0
- da Silva, E. G., Borges, M. de F., Medina, C., Hilsdorf Piccoli, R. & Freitas Schwan, R. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, 5(9):859–865 doi: 10.1016/j.femsyr.2005.02.006
- Soetaert, W. & Vandamme, E. J. (2010). Industrial Biotechnology (Sustainable growth and economic success) || The Industrial Production of Enzymes. 207-225. doi: 10.1002/9783527630233.ch5



## Práctica 8

### Extracción de aceites esenciales de cítricos

#### Introducción

Las frutas cítricas son fuente de aceites esenciales los cuales se encuentran principalmente en el epicarpio y tienen amplia aplicación en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Los aceites esenciales están constituidos por compuestos volátiles y son los responsables de los olores y sabores característicos de cada fruta. Estos se pueden extraer mediante diferentes métodos como: prensado en frío, hidrodestilación, hidrodifusión y microondas, entre otros. Además, mediante los procesos mencionados se obtienen aceites esenciales de menor calidad y el rendimiento es bajo. El prensado en frío no altera la composición química de los aceites esenciales, mientras que, en los otros métodos la temperatura puede ocasionar alteraciones químicas. Por lo cual el empleo de enzimas es una alternativa para extraer los aceites esenciales. Las enzimas empleadas son celulasas y pectinasas, las cuales ayudan a extraer los aceites esenciales porque provocan la disrupción de las células vegetales. Permitiendo así la liberación de los aceites esenciales y obteniendo un producto sin turbidez.

#### Objetivo

- Extraer el aceite esencial de la naranja por maceración enzimática.

#### Material y equipo

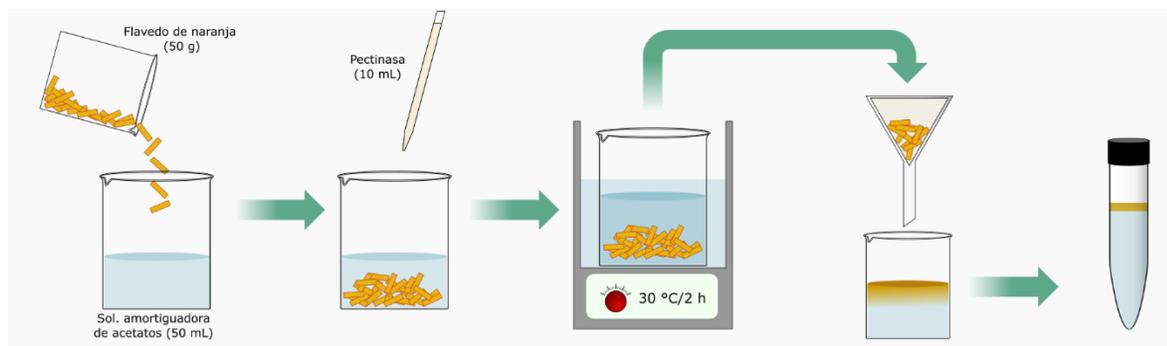
Material por equipo	Material por grupo
2 Vasos de precipitados de 250 mL	1 Matraz aforado de 50 mL
1 Matraces Erlenmeyer 250 mL	1 Agitador magnético
1 Termómetro	1 Vaso de precipitados de 100 mL
1 Probeta de 100 mL	1 Parrilla eléctrica
2 Pipetas graduadas de 10 mL	1 Balanza analítica
1 Gradilla	1 Espátula
2 Embudos de separación	1 Agitador orbital para matraces de 250 mL
1 Jeringa	1 Matraz aforado de 1000 mL
2 Tubos de centrifuga de 50 mL	1 Centrifuga
2 tapones de goma para los matraces	Agua destilada
1 Piseta con agua destilada	Gasa
1 Palangana	
1 Navaja de un filo	

#### Reactivos

Soluciones	Reactivos
Solución amortiguadora para calibrar a pH 4	Pectinasa (10 U/g)
Solución amortiguadora para calibrar a pH 7	Acetato de sodio
Naranjas	Ácido acético

## Procedimiento

1. Preparar una solución amortiguadora de acetatos 0.1M, pH 4.5.
2. Preparar una solución de pectinasa al 0.03% (p/v) en la solución amortiguadora de acetatos.
3. Pesar 50 g de flavedo, obtenidos por pelado manual utilizando guantes y una navaja de un solo filo, con la menor cantidad de albedo posible.
4. Colocar los 50 g de flavedo en 50 mL de solución amortiguadora de acetatos
5. Adicionar 10 mL de solución de pectinasa
6. La mezcla se deja macerar en agitación a 30 °C por 2 horas
7. La mezcla se deja enfriar hasta 4 °C. Después se prensarán manualmente las cáscaras y el sobrenadante se centrifuga a 4000 rpm por 10 minutos.
8. Separar el aceite de la mezcla con embudo de separación.
9. Hacer un control de extracción de aceite sin adición de la enzima (realizar los pasos 3 a 8).
10. Pesar el aceite extraído.



## Cálculos

Calcular el rendimiento de extracción sin adición de enzima y con adición de enzima.

Hacer una tabla de comparación de resultados de los equipos del grupo.

## Cuestionario

1. Según la norma oficial, ¿a qué se le considera "aceite esencial"?
2. ¿Cuáles son los tres métodos para la extracción de aceites esenciales?
3. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos de extracción?

## Referencias

- Ambriz-Pérez, D. (2021). Integral valorization from industrial Persian lime processing wastes (*Citrus latifolia* Tanaka): simultaneous recovery of oils and antioxidants. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 20(1):367-380.
- Armijo, J. (2012). Modelamiento y simulación del proceso de extracción de aceites esenciales mediante la destilación por arrastre con vapor. *Revista Peruana De Química e Ingeniería Química*, 15(2):19-27.

- Buevas Salgado, G. A., Patiño Gómez, J. H. & Cano-Salazar, J. A. (2012). Evaluación del proceso de extracción de aceite de aguacate hass (*Persea americana* Mill) utilizando tratamiento enzimático. *Revista Lasallista de Investigación*. 9(2):138-150.
- León Méndez, G. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(4):742-750.
- Mahato, M. (2021) Biotransformation of Citrus Waste-I: Production of Biofuel and Valuable Compounds by Fermentation. *Processes*, 9:220. doi: 10.3390/pr9020220



## Práctica 9

### Hidrólisis de la lactosa en leche

#### Introducción

En la industria de lácteos se ha implementado el proceso de hidrólisis de lactosa para ayudar a mitigar el problema que limita el consumo de leche a las personas que son intolerantes a la lactosa. La causa más común de esta condición es ocasionada por la deficiencia de la lactasa intestinal que ocurre en los adultos mexicanos. Además, otra causa de deficiencia de lactasa se presenta cuando existen enfermedades que dañan la mucosa intestinal y se disminuye la concentración de la enzima. Por otra parte, la hidrólisis de lactosa resulta ser importante para la industria de alimentos porque se pueden reducir los tiempos de fermentación en alimentos fermentados, como el yogurt; o también se puede aumentar el dulzor de algunos alimentos elaborados con leche deslactosada. La hidrólisis de la lactosa se realiza adicionando la lactasa en la leche, existen diferentes fuentes de la enzima por lo que se puede seleccionar la adecuada de acuerdo con el proceso en el que se implementará.

#### Objetivo

- Hidrolizar la lactosa de la leche y determinar el grado de hidrólisis.

#### Material y equipo

Material por equipo	Material por grupo
3 Vasos de precipitados de 250 mL	1 Balanza analítica
2 Matraces aforados de 100 mL	1 Glucómetro
1 Termómetro	Agua destilada
1 Probeta de 100 mL	
2 Pipetas graduadas de 5 mL	
1 Gradilla	
1 Baño de temperatura controlada	
1 Jeringa	
1 Espátula	
1 Piseta con agua destilada	
1 Palangana	
1 Mortero	

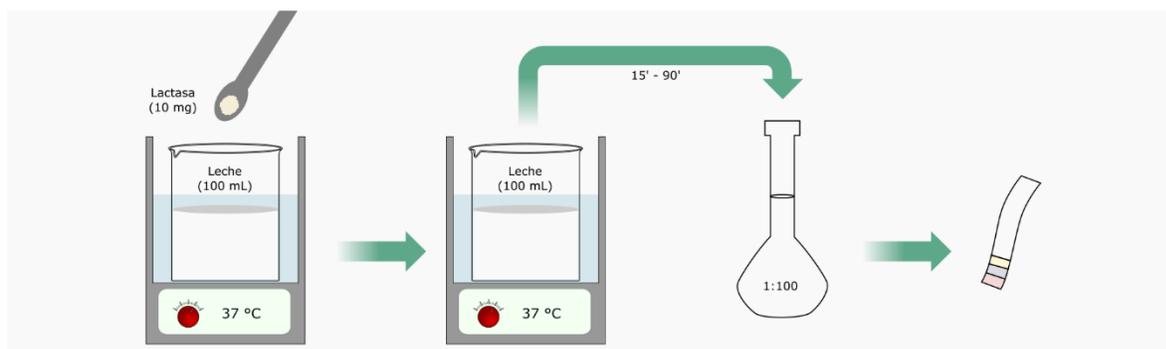
#### Reactivos

Soluciones	Reactivos
Leche pasteurizada	Lactasa
	Tiras reactivas para glucosa

#### Procedimiento

1. Colocar 100 mL de leche pasteurizada en un vaso de precipitados y ponerla en un baño de temperatura controlada a 37 °C para mantener la temperatura constante durante el proceso.

2. Adicionar 10 mg de lactasa (previamente pulverizada) y agitar para disolver perfectamente en la leche.
3. La mezcla se deja en el baño de temperatura controlada a 37 °C y cada 15 minutos se tomará una muestra de 1 mL para cuantificar la lactosa hidrolizada.
4. La muestra de leche será diluida 1:100 con agua destilada.
5. Se colocará una gota de la dilución en la tira reactiva para medir la glucosa liberada.
6. Realizar los pasos 4 y 5 para cada muestra de leche.
7. El proceso de hidrólisis de lactosa se realizará por 90 minutos.
8. Medir la glucosa libre en una leche deslactosada comercial.



## Cálculos

1. Calcular el porcentaje de hidrólisis de lactosa y comparar con una leche deslactosada comercial.
2. Hacer una tabla de comparación de resultados de los equipos del grupo.

## Cuestionario

1. ¿Qué es la leche deslactosada?
2. ¿Cuál es la reacción enzimática de la lactasa? Mencione sustrato, especificidad y condiciones.
3. ¿Cuál es el fundamento de las cintas reactivas para determinar glucosa?
4. Describa el proceso de elaboración de leche deslactosada.

## Referencias

- Badui Dergal, S. (2013). *Química de los Alimentos*. 5ª edición. México: Pearson.
- García-Garibay, M. Ramírez, R. Q. & Canales, A. L. M. (2004). *Biología Alimentaria*. 1ª edición. México: Editorial Limusa.
- Fontecha, J., Recio, I. & Pilosof, A. M. R. (2009). *Funcionalidad de componentes lácteos*. España: CYTED.
- Llerena Ramírez, C. (2019). Condiciones de hidrólisis de las lactasas Lactozym Pure 6500 L & Saphera 2600 L para la producción de leche deslactosada de cabra. *Tecnología Química*, 39(2):274-285.

## ANEXO 1

### 1. Elaboración de la curva patrón de azúcares reductores

#### Procedimiento

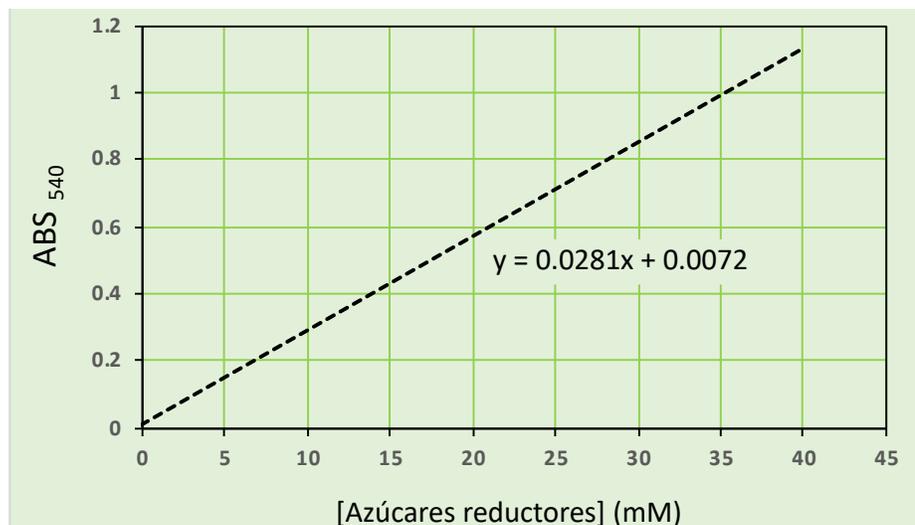
1. Preparar una solución patrón 0.01 M equimolar de fructosa y glucosa. Pesar 0.09 g de cada azúcar y vaciarlos en un matraz aforado de 100 mL. Aforar con agua destilada.
2. Preparar una serie de tubos como se indica en el siguiente cuadro:

Tubo	Solución patrón (mL)	Agua destilada (mL)
Blanco	0	1.0
1	0.2	0.8
2	0.4	0.6
3	0.6	0.4
4	0.8	0.2
5	1.0	0

3. Agregar 1 mL de la solución de DNS a cada tubo
4. Calentar en un baño de agua en ebullición durante 5 min todos los tubos
5. Enfriar en baño de hielo
6. Agregar 10 mL de agua destilada
7. Dejar reposar 15 min
8. Leer los tubos en el espectrofotómetro a 540 nm de absorbancia calibrando a cero con el tubo blanco.

#### Cálculos

1. Calcular la concentración de reductores (1 mol de azúcar 0 1 mL de reductores) en  $\mu\text{mol/mL}$  para cada tubo
2. Graficar los valores de absorbancia obtenidos, contra la concentración de azúcares reductores para cada tubo
3. Obtener la ecuación de la recta por regresión lineal.
4. Esta curva será utilizada para determinar la concentración de azúcares reductores en las prácticas.



## 2. Elaboración de solución de DNS (ácido dinitrosalicílico)

### Procedimiento

1. Para preparar la solución de DNS se pesan los reactivos como se indican en la tabla:

Reactivo	Cantidad (g)
Acido 3,5 dinitrosalicílico	10
NaOH	10
Sulfito de sodio anhidro	0.5
Fenol	2.0

2. Aforar con agua destilada a 1000 mL.
3. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente

## 3. Elaboración de la curva patrón de orto-nitrofenol-galactosa (ONPG)

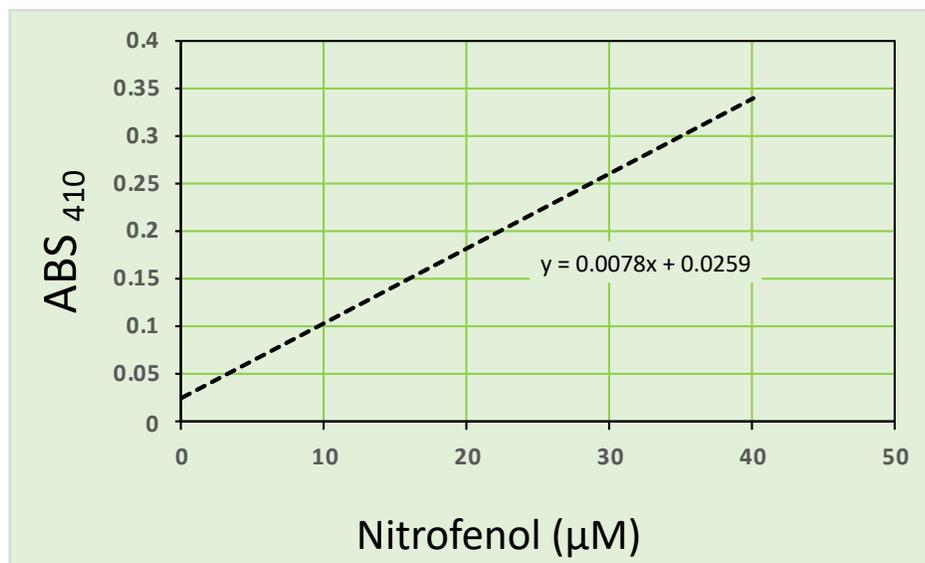
1. Preparar de una solución de nitrofenol a una concentración 3.6  $\mu\text{mol/mL}$ . Pesar 0.5 mg de nitrofenol y vaciarlo en un matraz aforado de 100 mL. Aforar con buffer de fosfatos pH 9 (0.1 mM).
2. Preparar una serie de tubos como se indica en el siguiente cuadro:

Tubo	Solución nitrofenol (mL)	Agua destilada (mL)
Blanco	0	1.0
1	0.2	0.8
2	0.4	0.6
3	0.6	0.4
4	0.8	0.2
5	1.0	0

3. Leer los tubos en el espectrofotómetro a 410 nm de absorbancia calibrando a cero con el tubo blanco.

## Cálculos

1. Calcular la concentración de nitrofenol en  $\mu\text{mol/mL}$  para cada tubo
2. Graficar los valores de absorbancia obtenidos, contra la concentración de nitrofenol para cada tubo
3. Obtener la ecuación de la línea por regresión lineal.
4. Esta curva será utilizada para determinar la concentración nitrofenol en las prácticas.



### **Tecnología Enzimática**

Se terminó de imprimir en diciembre de 2022,  
con un tiraje de 50 ejemplares, más sobrantes para reposición.





Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud



Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco, Núm. 186,  
Col. Leyes de Reforma 1ª Sección, Alcaldía Iztapalapa  
C.P. 09310, CDMX.