

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**TESIS:**

**Estimación de parámetros cinéticos de la actividad enzimática del extracto "*Saccharomyces cerevisiae*" de la levadura de panadería.**

Para optar el título profesional de:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

**Bach. Julio Cesar YARANGA MENDOZA**

ASESOR:

**Dr. José Alejandro YARLEQUÉ MUJICA**

**AYACUCHO - PERÚ**

**2024**

A mis padres: Zenobia Mendoza y  
Máximo Yaranga quienes fortalecieron  
mis sueños y que son mi razón de lucha  
diaria. Que en paz descansen. 1 de mayo  
del 2014.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi muy estimado y respetado Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por ser mi mentora en mi vida profesional inculcándome valores y principios.

A la Escuela Profesional de farmacia y Bioquímica, por acogerme en sus aulas, laboratorios y brindarme buenos docentes con mucha sabiduría.

A mis asesores, Dr. Bioquímico YARLEQUE MUJICA, José Alejandro, Dr. Tania A. Por su tiempo, paciencia y orientación día a día.

A mi familia por su apoyo económico y emocional desde la partida de mis padres.

## ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes	5
2.2. Redacción del marco teórico	8
2.3. Variable del estudio	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Ubicación	17
3.2. Definición de población y muestra	17
3.3. Métodos instrumentales para la recolección de datos	17
3.4. Procedimiento para la recolección de datos	17
3.4.1. Recolección de muestra	17
3.4.2. Aislamiento del enzima ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	17
3.5. Alcance de la investigación	18
3.6. Diseño experimental	18
3.7. Análisis de datos	19
IV. RESULTADOS	21
V. DISCUSIÓN	31
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	39
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
IX. ANEXOS	47

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. composición de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
Tabla 2. Resultados de los gráficos de los métodos de obtención	29

## ÍNDICE DE FIGURA

	Pág.
Figura 1. efecto de la velocidad inicial con respecto al programa Excel 2019, del extracto enzimático de la levadura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	22
Figura 2. la temperatura óptima de acuerdo al Excel 2019, del extracto enzimático <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la levadura de panadería.	23
Figura 3. efecto del pH Sobre la actividad <i>Saccharomyces cerevisiae</i> levadura de panadería.	24
Figura 4. representación gráfica del método de Michaelis-Menten del extracto enzimática de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la levadura de panadería.	25
Figura 5. Representación gráfica del método de Lineweaver-Burk del extracto enzimático <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la levadura de panadería.	26
Figura 6. Representación gráfica de Eddie-Hofstee Absorbancia/Concentración de sustrato [S] vs Absorbancia, del extracto enzimático de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> de la levadura de panadería.	27
Figura 7. representación gráfica de Hanes-Woolf Concentración de Sustrato [S] vs Concentración de Sustrato [S]/Absorbancia, del extracto enzimático de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> de la levadura de panadería	28

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Equipo espectrofotómetro evolution 201 (Thermo scientific) del laboratorio de Bioquímica y Farmoquímica "Juan de Dios Guevara" M.B. José A. Yarleque Mujica.	48
Anexo 2. Resultados de las Pruebas para determinar la velocidad inicial del extracto enzimático <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la levadura de panadería.	49
Anexo 3. Resultados para determinar la temperatura óptima del extracto enzimático <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la levadura de panadería.	50
Anexo 4. Resultados para determinar el pH óptimo del extracto enzimático <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la levadura de panadería.	51
Anexo 5. Pruebas sometidas a baño María (BM) del extracto enzimático <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la levadura de panadería.	52
Anexo 6. Pruebas sometidas a baño María (BM) a 100°C por medio de una cocinilla eléctrica de las pruebas realizadas del extracto enzimático <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la levadura de panadería.	53
Anexo 7. Calibrando el pHmetro con sus buffers respectivos para realizar las pruebas realizadas del extracto enzimático <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la levadura de panadería.	54
Anexo 8. Diluciones consecutivas de la concentración de sustrato del extracto enzimático <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la levadura de panadería.	55
Anexo 9. Lectura de los resultados de la concentración de sustrato en el espectrofotómetro evolución 201 (Thermo scientific) del laboratorio de Bioquímica y Farmoquímica "Juan de Dios Guevara" M.B. José A. Yarleque Mujica, De la Facultad de Ciencias de la Salud.	56

Anexo 10.	Lectura de los resultados de la temperatura óptimo en el espectrofotómetro evolución 201 (Thermo scientific).	57
Anexo 11.	Lectura de los resultados de la pH óptimo en el espectrofotómetro evolución 201 (Thermo scientific).	58
Anexo 12.	Lectura de los resultados de la velocidad inicial en el espectrofotómetro evolution 201 (Thermo scientific).	59
Anexo 13	Gráfica elaborado en papel milimétrico de la velocidad inicial.	60
Anexo 14	Gráfica elaborada en papel milimétrico de la temperatura óptima.	61
Anexo 15	Gráfica elaborada en papel milimétrico del pH óptimo	62
Anexo 16	Gráfica elaborada en papel milimétrico del método de Michaelis – Menten	63
Anexo 17	Gráfica elaborada en papel milimétrico del método de Lineweaver – Burk.	64
Anexo 18	Gráfica elaborada en papel milimétrico del método de Eddie Hofstee.	65
Anexo 19	Gráfica elaborada en papel milimétrico del método de Hanes woosf.	66
Anexo 20	Ensayo 1, determinación de la velocidad inicial	67
Anexo 21	Ensayo 2, determinación de la temperatura óptima.	68
Anexo 22	Ensayo 3, determinar el pH óptimo	69
Anexo 23	Ensayo 4, determinación de la velocidad inicial velocidad máxima y constante de Michaelis	70
Anexo 24	Valores de absorbancia de los parámetros cinéticos del extracto enzimático “ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ” de la levadura de panadería.	71
Anexo 25	Prueba pos hoc Tukey: identificación que grupos son iguales o diferentes.	72
Anexo 26	Matriz de consistencia	73

## RESUMEN

La invertasa llamada también como  $\beta$ -fructofuranosidasa de la *Saccharomyces cerevisiae* es una enzima que cataliza la hidrólisis de sacarosa, el cual es hidrolizado a fructosa y glucosa. Tanto microorganismos como animales y vegetales poseen enzimas con actividad invertasa, que participan en el catabolismo de los fructanos y más aún en el azúcar, lo cual es de gran interés industrial. El objetivo del presente trabajo, es la de estimar los parámetros cinéticos del extracto enzimático *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería, obteniendo el extracto mediante una extracción liofilizada de levadura seca en 200 mL de tampón acetato (tampón de acetato a 0.1 M pH 5 a 0,5 M en NaCl). Para la determinación de las condiciones óptimas de la actividad enzimática se utilizó el reactivo DNS (ácido 3,5 - dinitrosalicílico) conocido como método de Miller G. A fin de determinar la hidrólisis de la sacarosa y los parámetros cinéticos. El extracto presentó una temperatura óptima 55 °C, pH óptimo 5. Los resultados se calcularon mediante la ecuación de Michaelis-Menten  $V_{max} = 1.846$  min,  $K_m = 26$  mM y  $V_0 = 1.634$  min, Lineweaver-Burk que  $V_{max} = 1.346$  min,  $K_m = 12.886$  mM,  $V_0 = 1.265$  min, y  $R^2 = 0.93$ , Eddie Hofstee  $V_{max} = 1.857$  min,  $K_m = 18.945$  mM,  $V_0 = 1.696$  min, y  $R^2 = 0.91$ , Hanes Woofs  $V_{max} = 2.335$  min,  $K_m = 32.269$  mM y  $V_0 = 2.011$  y  $R^2 = 0.97$ , y una velocidad inicial  $V_0 = 0.1422$  min, Se concluye indicando que la invertasa de levadura de panadería tiene mayor rendimiento a temperatura óptima 55°C y pH óptimo 5, con un mayor estabilidad, rendimiento y eficacia.

**Palabra clave:** invertasa, parámetros cinéticos, temperatura óptima, pH óptimo, método Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Eddy Hofstee y Hanes Woolf.

## I. INTRODUCCIÓN

La harina de trigo está compuesta por un aproximado de 1 % de fructanos. En la masa, los fructanos están en una concentración similar al de los azúcares agredos. Se sabe muy poco el papel de los fructanos en la cocción del pan. La levadura de invertasa es una  $\beta$ -fructofuranosidasa, por lo cual es capaz de hidrolizar los enlaces de los fructanos, no se sabe hasta qué punto, pero en la ausencia de la glucosa y la fructosa será fermentado la masa por la levadura.<sup>1</sup> Los fructanos son muy importantes, como fuente de azúcares fermentables durante la producción del pan. Struyf, Demostró que la hidrólisis de los fructanos del grano de trigo representa una producción de dióxido de carbono durante las primeras etapas de producción del pan en el proceso de fermentación de la masa.<sup>2</sup> Lo cual es producido por la hidrólisis del fructano en el mezclado y fermentación de la masa, la cual esta influenciada por invertasa de la levadura.<sup>3</sup>

Los primeros microorganismos utilizados como principal fuente de proteínas fueron las llamadas levaduras, las *Saccharomyces cerevisiae*, que es considerado hoy en día uno de las más importantes fuentes de proteínas unicelulares.<sup>4</sup> Las enzimas obtenidas de microorganismos han sido muchas veces estudiadas, como la levadura de fructofuranosidasa más conocido como invertasa, que cataliza la hidrólisis de sacarosa produciendo una mezcla equimolar de glucosa y de fructosa llamado como azúcar invertido, comúnmente utilizada en la industria alimentaria y farmacéutica.<sup>5</sup> También la invertasa es utilizado para la producción de confiterías, por presentar un producto de reacción incoloro, a diferencia del hidrólisis ácida, este tipo de hidrólisis usualmente se realiza en la industria alimentaria, lo cual proporciona una mayor

ventaja, como son la selectividad y las condiciones de una reacción moderada de la temperatura y el pH, lo cual ocurre en un rango de temperatura de 40 °C y 60 °C, y pH de 4 y 8. Por tanto siendo la  $\beta$ -D-fructofuranosidasa utilizada en la inversión de sacarosa, presentando una característica inocua y seguro para el ambiente,<sup>6</sup> muy beneficiosos como catalizadores puesto que aumenta la velocidad de reacción química, muchas más que otros catalizadores artificiales, los cuales son específicos puesto que ellos induce a la transformación de sustancias y no de otras sustancias que se puedan encontrar en la reacción.<sup>7</sup>

Las enzimas suelen inactivarse por el exceso de calor, esto sucede ya que son proteínas, y pueden desnaturalizarse a temperaturas altas, por lo cual las enzimas poseen una temperatura óptima, es decir, a ciertas temperaturas las enzimas realizan una actividad catalizadora, alcanzando su mayor velocidad de reacción catalizadora.<sup>8</sup> En las enzimas la velocidad de la catálisis o la velocidad de la reacción son diferentes, debido a las concentraciones molares de su sustrato. Cuando baja la concentración de sustrato, la velocidad es linealmente y proporcional a la concentración, y cuando la concentración de sustrato es alta, la velocidad es independiente de la concentración de sustrato.<sup>9</sup>

La levadura es muy importante en diversos procesos industriales como por ejemplo en la elaboración de proteínas de origen celular para el consumo de las personas y animales, muy importante en los procesos de la fermentación para la elaboración de bebidas con alcohol. También en la elaboración de proteínas recombinantes. La *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos más estudiados y distribuido comercialmente, se utiliza generalmente como sistema libre en fermentación sumergida. En lo que respecta a la elaboración de bebidas de fermentación, las invertasas, como la *Saccharomyces cerevisiae* juegan un papel muy indispensable en los productos finales,<sup>13</sup> como por ejemplo en la preparación de los jarabes de azúcar invertido son utilizados como aditivo, muy utilizado en la industria de alimentos y farmacéutica, sus propiedades nos indican que es más dulce que la sacarosa y se incorpora en la preparación de alimentos por sus características, porque no tiene los problemas de cristalización de su precursor en soluciones altamente concentradas. Los métodos enzimáticos para obtener los jarabes de glucosa y fructosa, se utiliza la hidrólisis ácida debido a su mayor especificidad de la enzima,

productos claros, mayores rendimientos y mayor grado de pureza.<sup>14</sup> Frente a estas premisas el presenta trabajo plantea los siguientes objetivos:

**Objetivo general**

Estimar los parámetros cinéticos del extracto enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.

**Objetivos específicos**

- Determinación de la velocidad inicial ( $V_0$ ),  $V_{max}$  y  $K_m$  del extracto enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.
- Determinar la temperatura óptima del extracto enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.
- Determinar el pH óptimo del extracto enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.

## II. MARCO TEORICO

### 2.1. Antecedentes

Las investigaciones relacionadas con la enzima *Saccharomyces cerevisiae* en la actualidad se limitan mayormente a aspectos bioquímicos tal como refieren Shi *et al*<sup>4</sup> y Bayramoglu *et al*<sup>5</sup>, así como estudios biológicos y químicos.

Respecto a los parámetros cinéticos se han investigado muchos autores entre ellos tenemos investigaciones realizadas en el Instituto Politécnico Nacional Martínez *et al*,<sup>41</sup> informó sobre los parámetros cinéticos de la invertasa principalmente de temperatura y pH, de la actividad del enzima. Así mismo Trujillo<sup>16</sup>, determinó la temperatura y el pH óptimo en donde la enzima invertasa demuestra su actividad máxima.

Las referencias consignadas se tratan de la  $\beta$ -fructofuranosidasa, también conocida como la enzima invertasa, es una especie de enzima hidrolasas que reportan numerosas investigaciones, las cuales orientaron la presente investigación.

En el año 2014, Placencia *et al*<sup>15</sup>. Llevaron a cabo una investigación titulada, efecto de la desglicosilación sobre las propiedades de la invertasa termófila purificada de la levadura *candida guilliermondii* *Mplla*, con el objetivo de purificar y caracterizar bioquímicamente las propiedades de la invertasa. Para realizar el estudio se determinó la concentración de sacarosa al 200M, lo cual se obtuvo una específica de 82,027 U/mg de proteína. Los cual mostró una actividad óptima a pH 5,0 y a temperatura de 64°C. los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  para INV3a-n fueron de 0,104 Mm y 10,9 umol/min/mg de proteína. La investigación concluye que la enzima retuvo el 50 % y el 20 % su actividad máxima después de 168 h y 30 días a 55 °C, y la actividad

de la enzima bajó lentamente a mayor concentración del sustrato. Lo cual se concluye también que la enzima es activa a concentraciones de sacarosa, puede preferir un candidato ideal para muchas aplicaciones industriales que involucran a sustratos con alto contenido de azúcar o para mejorar la elaboración de etanol a partir de melaza de caña.

En el año 2015, Trujillo<sup>16</sup>, realizó una investigación sobre la purificación y caracterización bioquímica de una  $\beta$ -fructofuranosidasa con fructosiltransferasa producida por la levadura *Torulaspota delbrueckii*, con el objetivo de purificar y caracterizar bioquímicamente de una enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa con la actividad fructosiltransferasa, para realizar el estudio se utilizaron los sustratos de sacarosa, fructanos de agave, inulina, y levano, también se determinó el pH óptimo de 5 y la temperatura a (30, 40, 45, 50, 55 y 60°C para cada sustrato), y los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$ . Lo cual se obtuvo que la  $\beta$ -fructofuranosidasa purificada demostro una alta reacción catalítica en la sacarosa y las propiedades bioquímicas semejantes a la invertasa producido por *Sacharomyces cerevisiae* y las fructanasas elaboradas por *K. marxianus* y la  $\beta$ -fructofuranosidasa extracelular elaboradas por *T. delbrueckii*, presentaron propiedades semejantes al exo-fructanhidrolasas producido por la *k. maximus*, también presentó características semejantes de invertasa producido por *Saccharomyces cerevisiae*, la investigación concluye que tal vez pudiera ser caudado por la aproximación filogenética entre estas levadura.

En el año 2027, Vera *et al*<sup>17</sup>, Llevaron a cabo una investigación llamado extracto optimizado y purificada y purificación parcial de invertasa aislada de *S. cerevisiae* en puré de durazno, con el objetivo de extraer por medio de un proceso de autólisis, se determinó los efectos de la liofilización y purificación en la actividad de la invertasa, usando el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a 490 nm. Dando como resultado una linealidad cuadrática del modelo, de manera polinómica de la reacción de segundo orden, se explayo el fenómeno de extracción de la enzima invertasa, con una erre cuadrada de  $R^2$  de 0,80 y con una actividad significativa dependiente de ambas incógnitas. La investigación concluye que la máxima extracción se presenta en el punto alto de la experimentación con una actividad de  $14,7 \text{ U.mg}^{-1}$ . Dado estas características, la óptima condición para la obtención de la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* aislado de puré del durazno, concluye que el etanol es más útil que la acetona para la obtención la actividad específica.

En el año 2019, Romero *et al*<sup>18</sup>, Llevaron a cabo una investigación llamada, hidrólisis de sacarosa por invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizado sobre nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto, con el objetivo de desarrollar un diseño alternativo para realizar la hidrólisis de sacarosa por medio de  $\beta$ -D-fructofuranosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, inmovilizada sobre los nanopartículas magnéticas del ferrita de cobalto, lo cual se determinó por el análisis espectrofotométrico para la determinación de proteínas de Bradford, se estudió el comportamiento catalítico del enzima de acuerdo al pH y temperatura. Se obtuvo que el pH óptimo fue 0,5 más para la enzima inmovilizada a comparación de la enzima libre. Y la temperatura óptima de 55°C, la enzima libre e inmovilizada. la inmovilización el  $V_{max}$  baja en un 2,96 % y el  $K_m$  sube a un factor de 1,7. La investigación concluye que las bio-nanopartículas retuvieron un 95,89 y 91,79 % de su actividad inicial, en el segundo y tercer ciclo de uso.

En el 2020, Oliver *et al*<sup>19</sup>, Realizaron estudios llamado estudio cinético/termodinámico de  $\beta$ -fructofuranosidasa inmovilizada de *Aspergillus tamarii* URM4634 en perlas de quitosano y aplicación en la producción de azúcar invertido en reactor de lecho empacado, con el objetivo de inmovilizar covalentemente a la  $\beta$ -fructofuranosidasa (FFase) de *Aspergillus tamarii* URM4634 en perlas de quitosano, se estudió en términos de parámetros cinéticos y termodinámicos, lo cual se aplicó la conversión de azúcar para la producción de invertasa en un reactor de lecho empacado (PBR), se obtuvo que el pH de 5,0 y a temperatura 60°C (FFase) era termoestable a 50 – 55°C. a 50°C esto indica que la FFasa inmovilizada era estable a la temperatura comúnmente utilizada en la producción de azúcar invertido, los altos valores de  $E^*d$ ,  $\Delta H^*d$  y  $\Delta G^*d$  confirmaron la termoestabilidad de FFasa. La investigación concluye en una buena indicación que la FFasa inmovilizada en perlas de quitosano en PBR es eficiente para invertir la producción de azúcar para la industria alimentaria.

En el año 2021 Micheo<sup>20</sup>, realizó un estudio titulado, determinación de las condiciones óptimas experimentales de un proceso de hidrólisis catalizada por la enzima invertasa en la producción de mieles invertidas de caña de azúcar a fin de obtener miel de alta pureza a nivel laboratorio, con el objetivo de evaluar las circunstancias óptimas para la actividad de la  $\beta$ -fructofuranosidasa, con la finalidad de conseguir la mayor hidrólisis del azúcar, para adecuar el desarrollo de elaboración

de la miel de  $\beta$ -fructofuranosidasa. Lo cual se determinó las reacciones enzimáticas de inversión del azúcar en la mezcla de meladura, donde se observó la cantidad de azúcar invertida, abocándose al parámetro analítico como fase de observación, de quince minutos de inversión y la finalización después de ocho horas, dio como resultado que la alta inversión de la azúcar se consiguió al emplear una concentración de 0,066 g/0.5 L, nos mostró un pH 5,5 y temperatura 50°C en siete horas de inversión. Lo cual se concluye que el Brix (concentración de sólidos disueltos en la solución) no influye en la recuperación de los azúcares reductores.

En el año 2021, Federico<sup>21</sup>, realizó una investigación llamada estudio de la actividad en mieles en el departamento de Cruz del eje (Córdoba) tratamiento térmico y posible adulteración, para obtener mieles de alta fluidez y más tentadora para el consumo, fue determinada por el método modificador Siegenthaler y los resultados fueron empleadas en el método de Michaelis-Menten dentro del rango de 30°C a 60°C y temperatura óptima para la enzima purificada de *S. cerevisiae* es de 40 °C y la constante de Michaelis es de ( $K_m = 0.22$  mM a 0.02 mM, y la  $V_{max} = 1.81$  a 0.04  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) lo cual dio como resultado la disminución de NI por debajo de 10 minutos recomendado internacionalmente, la reducción de la  $\alpha$ -glucosidasa es de 33% para la miel con el tratamiento a 60 °C por 20 minutos y de 37% para la miel que recibieron un tratamiento a 70 °C durante 15 minutos y 20 minutos, y sin pre calentamiento a 50 °C durante 30 minutos, llegando a la conclusión que la  $\alpha$ -glucosidasa que si se puede diferenciar la alteración de la miel a partir de 20% P/P del jarabe.

## **2.2. Redacción del marco teórico**

### **2.2.1. *Saccharomyces cerevisiae***

#### **2.2.1.1. Historia de la enzima**

Durante muchos años, las enzimas fueron utilizados en procesos de fermentación, como; para la elaboración de vino, queso, cerveza y pan. En el año de 1860, L. Pasteur informó que los fermentos estaban profundamente ligados con el esqueleto viral de las levaduras. En 1876 William Kuhne les planteó denominarlo como enzima, una palabra que tiene origen griego que EN significa (en) y zyme que significa (levadura). En el año de 1897, Eduard Buchner demostró que algunas enzimas podrían extraerse de las levaduras y usarse.<sup>22</sup> Se empezaron a extraer diferentes

enzimas para diferentes usos. Se distribuyó a distintos sectores de la industria como, por ejemplo; fabricación de azúcares, aceites, destilería, detergentes, grasas y almidones. En 1982, una industria finlandesa comenzó a desarrollar enzimas alimenticias.<sup>23</sup>

#### **2.2.1.2. Enzimas**

Son proteínas, polímeros formados por aminoácidos covalentemente unidos entre ellos, que tienden a catalizar en los organismos una gran variedad de reacciones químicas, su actividad catalítica de las enzimas, depende de que mantenga la unión entre la proteína y el sustrato que se convierte en producto, al finalizar la transformación del sustrato, el sustrato al liberarse del producto del sitio activo, la enzima regresa a su estado original, se puede volver a unir a otro sustrato y volver a realizar el ciclo nuevamente, el ciclo de catálisis.<sup>24</sup>

#### **2.2.1.3. Invertasa**

La invertasa (EC 3.2.1.26) denominada también como  $\beta$ -D-fructofuranosidasa de la *Saccharomyces Cerevisiae*, es utilizada principalmente en las industrias alimenticias y farmacéuticas, permite la obtención de azúcares invertidos, a través de la hidrólisis de la sacarosa para formar fructosa y glucosa. Estos azúcares invertidos son usados por su característica humectante y a baja inclinación a cristalizarse, menor higroscopicidad y baja actividad cariogénica, a diferencia del azúcar normal.<sup>25</sup>

#### **2.2.1.4. Características de la levadura *Saccharomyces cerevisiae***

Su nombre deriva del vocablo Saccharo (azúcar), myces (hongo) y cerevisiae (cerveza). La levadura que forma parte de la agrupación de microorganismos más profundamente afiliado al desarrollo y satisfacción a la humanidad.<sup>26</sup> Es una levadura heterótrofa, que recibe la fuerza a partir de la glucosa y tiene una alta cualidad de fermentación,<sup>27</sup> por lo cual se puede aislarse con mucha facilidad en la tierra y en las plantas, así también en el tracto gastrointestinal y genital de las personas, es un producto del proceso de producción de alcohol, constituye una gran fuente de proteínas y vitaminas para la alimentación animal.<sup>28</sup> Esta levadura es una especie de microorganismo llamada GRAS, lo cual fue aprobado como agregado alimentario.<sup>29,30</sup> A lo cual se afirma que la crema de *Saccharomyces cerevisiae* concentrada, tiene valores de sustancia árido 18-20% y proteína bruta (PB) 32–36% de base árido.<sup>31</sup> Muchos investigadores afirman y sustentan que la formación promedio de proteínas 40,20 %.<sup>32</sup> Mientras que otro autor registraron valores algo bajos en torno a 39 %.<sup>33</sup>

**Tabla 1** composición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

<b>COMPONENTES (%)</b>	<b>Otero M.A.Cuba 1989</b>	<b>García J.2000</b>	<b>Otero M.A.2012</b>	<b>Yamada E.A. 2009</b>
Polisacárido	29,71	34,1	36	31,40
Trehalosas	NR	5	NR	NR
Ácido nucleico y nucleótido	10,65*	10,8	7,41*	9,00*
Fosfolípido	1,18	4,5	2,63	0,5
Triglicérido	NR	2,5	NR	NR
Esteroides	NR	1	NR	NR
ceniza	8,32	3,1	7,34	4,60
Proteína	40,20	39	44,7	42,67

**Fuente:** (Otero M.A. 1989, García J. 200, Otero M.A. 2012, Yamada E.A. 2009), **NR** (No referido), \* (manifestado en ARN).

Con respecto a la formación de la levadura de destilería, afirma que la variación dependía mucho de su potencial propios de elaboración de alcohol y de su normativa de ejecución.<sup>34</sup>

#### **2.2.1.5. Mecanismo de acción de la enzima**

la enzima se enlaza en las partículas de sustrato, específicamente en sitio activo para la enzima mediante interacciones débiles, como los enlaces puentes de hidrógeno y unión específica. En cuanto la enzima acepte al sustrato y se acople a ella, se transforma a un complejo llamado complejo E-S. El rompimiento y la creación de las uniones se realizan por medio de las interacciones entre las secuencias de los lados de la enzima y las uniones al interior del sustrato, debido a que se han transformado en productos obtenidos llamado complejo enzima-producto, finalmente los productos se separarán de la enzima recuperándose esta para reaccionar nuevamente con otros sustratos, quiere decir que al pasar el tiempo la reacción de la enzima no cambia.<sup>35</sup>

#### **2.2.1.6. Cinética de la enzima invertasa**

La relación entre sustrato, enzima y velocidad de reacción se describe:



la unión de enzima sustrato correcto en el lugar activo, el complejo sufre un cambio químico para cambiar a productos. Esta ecuación está gobernada por la ley de acción

de masas, por lo cual, donde las ecuaciones de sustrato son altas, el equilibrio se desplaza hacia la derecha, favoreciendo la generación de productos. Cuando el sustrato está en baja concentraciones, su disponibilidad limita la velocidad, mientras que cuando el sustrato supera la capacidad de la enzima, la velocidad enzimática es el factor limitante.<sup>36</sup>

#### **2.2.1.7. Sitio activo**

El sitio activo es el lugar donde se lleva a cabo la unión o transformación química, el sitio activo de la mayoría de las enzimas se encuentra en el interior de las mismas. Podemos afirmar que también el sitio activo en general está localizado en una cavidad a lo cual se accede por túneles o canales. El tamaño de la cavidad depende del tamaño del sustrato, lo cual la cavidad es pequeña considerando el volumen de la proteína. Dentro de estas cavidades se encuentran aminoácidos que llevan a cabo la reacción química (aminoácidos catalíticos) y que participan en la unión del sustrato (aminoácido de unión o de binding).<sup>45</sup>

#### **2.2.1.8. Mecanismo de la hidrólisis de sacarosa por la enzima invertasa**

Esta enzima que hidroliza a la sacarosa se llama comúnmente como invertasa o  $\beta$  – D – fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26) las cuales catalizan la liberación de  $\beta$  – fructosa a partir del extremo no reductor de sustrato del tipo  $\beta$  – D – fructofuranosidos en el enlace O – glicosídico. La reacción inicia por un mecanismo de desplazamiento del doble en el cual se forma un intermediario covalente glicisil – enzima. Esta enzima produce azúcares invertidos no cristalizados en una mezcla equimolar de 1:1 de D – glucosa (destrorotatorio) y D – fructosa (levorotatorio).<sup>46,47</sup>

#### **2.2.1.9. Cinética de las reacciones**

La rapidez de la reacción química tiene que ver mucho de una serie de causas tales como las concentraciones de moléculas que actúan, la presión, temperatura, la ausencia o presencia de catalizadores, así también como el pH del medio. La velocidad de reacción se puede medir determinando la cantidad de sustancia que reacciona, desaparece o se produce, en la unidad de tiempo. Para que la medida así efectuada sea válida es preciso que el intervalo de tiempo puede ser corto, y la medida se haga a la primera fase de la reacción, pues de otra manera se introduce un error considerable, sobre todo en los casos en que la enzima puede envenenarse por algún producto de la reacción. Generalmente la velocidad de reacción es función de la

concentración de una o más sustancias presentes. Esto se expresa de una manera conveniente por medio del orden de reacción.<sup>37</sup>

#### **2.2.2.0. pH y concentración**

La actividad enzimática se encuentra en relación con el estado iónico de la molécula, principalmente en su parte proteica, las series polipeptídicas tienen grupos que puedan ionizar como los grupos de carboxilos y grupos de los aminoácidos, dependiente del pH. El pH puede variar ampliamente, el pH óptimo se encuentra entre 4 y 8. La enzima que son expuestos a pH altos, se alteran o descomponen.<sup>38</sup> Una gran parte de las enzimas poseen un rasgo distintivo del pH, lo cual se debe por la titulación de grupos cargados que interactúan en la reacción de catálisis, de las secuencias de los lados, intervienen en la reacción de catálisis generalmente son secuencias de los lados polares, por lo cual están relacionados los grupos de amino y de carboxilo finales de las enzimas. La mayor parte de enzimas tienen pH característicos donde presentará su mejor actividad, por alto o debajo de este pH su eficiencia declina. La acción del pH sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas se aplica teniendo en cuenta que las enzimas son polielectrolitos que responden a cualquier cambio de pH. Como otras proteínas, el pH determina las especies iónicas del sustrato que predomina en la solución. El pH influye en una reacción catalizada enzimáticamente. Los lugares activos de las enzimas se constituyen un grupo ionizable, con el objetivo de sostener la configuración del lugar activo, para catalizar la reacción. Un análisis completo de los efectos del pH puede ser muy complejo, especialmente si consideramos que muchos compuestos biológicos poseen múltiples grupos ionizables y que el sitio activo de una enzima puede poseer dos o más grupos ionizables y que el sitio activo de una enzima pueden también poseer dos o más conjuntos ionizables que deben de estar en forma iónica correcta para que se dé la unión o la catálisis del sustrato.<sup>37</sup>

#### **2.2.2.1. Temperatura**

Las temperaturas se encuentran dentro de 30 y 40 °C, cuando aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de reacción. Un aumento del 10 °C puede duplicar o hasta triplicar la velocidad de reacción. Este incremento de grados puede desactivar a la enzima por el aumento de calor. Casi todas las enzimas son sensibles al calor, por lo tanto, es preferible administrar 40 °C a 80 °C por un tiempo de 2 a 5 min. Con la finalidad de destruir su actividad,<sup>38</sup> generalmente el aumento de la temperatura

aumenta también la velocidad de reacción química. El aumento de la temperatura termina al llegar a los 45 °C o 50 °C, si excede llevará al enzima a la desnaturalización de las proteínas, a causa del calor. Un incremento del calor puede causar un incremento en la velocidad de reacción enzimática de muchas maneras. Al analizar y experimentar los resultados, se hallan la temperatura óptima. Pocos organismos o procesos bioquímicos pueden resistir temperaturas por encima de 50 °C por largo tiempo, esto resulta de cambios irreversibles estructurales que alteran los mecanismos o disminuyen los organismos. Procesos como la coagulación de la albúmina de huevo que sucede durante el cocimiento, es aún más rápida a altas temperaturas, sin embargo, si una proteína se desnatura primero cuidadosamente ella se puede renaturalizar más rápidamente a bajas temperaturas, que altas temperaturas.<sup>37</sup>

#### **2.2.2.2. Michaelis-Menten**

La ecuación de Michaelis-Menten es lo más conocido por los bioquímicos, se puede encontrar el método de Michaelis-Menten, que es el eje principal lo que da inicio al estudio de la cinética enzimática, lo cual describe perfectamente a la velocidad de reacción. La ecuación de Michaelis-Menten.<sup>40</sup>

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Desde esa reunión en 1912 de los investigadores, Leonor Michaelis y Maud Menten colaboraron para investigar, por lo cual brotó la ecuación denominada ecuación de Michaelis - Menten un término matemático tan sencillo y práctico en el estudio de la bioquímica, logrando así un reconocimiento mundial. Esta ecuación es capaz de detallar la alteración causado por la reacción catalítica, al cambiar la concentración de un sustrato. La reacción que se establece entre E/S, esta va acompañada de la creación de un complejo. Leonor Michaelis nombre como constante de Michaelis ( $K_m$ ) que establece la proximidad de la enzima y el sustrato. mostro la rapidez de reacción y predijo la cantidad de sustrato que interactúan entre sí. por un tiempo, donde llega a su velocidad máxima ( $V_{max}$ ).<sup>40</sup>

#### **2.2.2.3. Lineweaver-Burk**

El método de Lineweaver Burk que se utiliza como método para graficar con la cual se puede calcular los parámetros cinéticos. Muy sencillo de aplicar y fácil de

representar. El diagrama muestra datos de interés para la investigación de la bioquímica. Ecuación de Lineweaver-Burk.<sup>40</sup>

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

En la

gráfica de Lineweaver Burk, se puede reconocer la constante de Michaelis  $K_m$  y la velocidad máxima  $V_{max}$ , se da el inicio en el eje de las ordenadas lo cual es el valor  $-1/K_m$ , ya que este método tiene inconveniencias, al requerir de dobles inversos, muestran errores experimentales que puedan llevar a altos errores. Estos acontecimientos erran a mayores concentraciones, la gráfica logra dar sitio para calcular de error. Si los ensayos se proyectan metodológico los resultados son absolutamente confiables.<sup>40</sup>

#### **2.2.2.4. Velocidad inicial ( $V_0$ )**

Es la modificación en la concentración del producto en el primer segundo de una reacción lo cual se determinará por la pendiente de la recta, descubierto al tiempo 0, no obstante, cuando la velocidad cambia seguidamente a medida que la reacción se acerque a su estabilidad, cuando el equilibrio es cero, la velocidad inicial se determina experimentalmente con la concentración de los reactivos. La rapidez inicial de una reacción catalizadora, va a depender de la cantidad de sustrato presentes y la concentración de una enzima (S/E), podemos concluir que la velocidad de una reacción depende de la concentración de sustrato como de la enzima.<sup>43</sup>

#### **2.2.2.5. Velocidad máxima ( $V_m$ )**

Es la velocidad obtenida en condiciones de saturación entre la enzima y el sustrato en condiciones óptimas de temperatura, pH y fuerzas iónica, la rápides máxima es constante para una concentración definida de una enzima.<sup>43</sup> La rapidez de una reacción es la cifra de moléculas de sustrato que se convierten en producto. La rapidez de una reacción catalizada por enzimas aumenta con la concentración de sustrato hasta que se alcanza una velocidad máxima.<sup>44</sup>

#### **2.2.2.6. Constante de Michaelis- Menten ( $K_m$ )**

La particularidad de una enzima y el sustrato particularmente se manifiesta su atracción de ES. La  $K_m$  es igual a la concentración del sustrato o es la mitad de la rapidez máxima, no varía con la concentración de enzima. Cuando la  $K_m$  es

disminuida (baja) se manifiesta una gran afinidad de la enzima por su sustrato debido a que se requiere una baja concentración de su sustrato para llenar la mitad del enzima, para alcanzar una rapidez que sea la mitad de la velocidad máxima y cuando la  $K_m$  es alta manifiesta una baja atracción de la enzima por su sustrato, debido a que una alta concentración del sustrato es necesario para llenar la mitad de la enzima. el significado  $K_m$ , pudiera creerse que el concepto de constante de Michaelis-Menten carece de importancia fisiológica o clínica nada más alejado de la realidad. Todos los ensayos enzimáticos validos que se llevan a cabo en los laboratorios clínicos se basan en el conocimiento del valor de  $K_m$  para cada sustrato. En el control fisiológico del metabolismo de la glucosa y del fosfato intervienen dos hexoquinasas, una elevada  $K_m$  para la glucosa y otra de baja de  $K_m$ . Ambas contribuyen al mantenimiento de los niveles de estacionarios de glucosa y fosfato de la sangre, en general los valores de  $K_m$  son cercanos a las concentraciones de sustrato que se dan en las células porque las enzimas se han desarrollado centros de unión de sustrato con una afinidad comparable a los niveles presentes *in vivo*.<sup>43</sup>

### **2.3. Variable del estudio**

#### **a) Variable 1.**

Parámetros cinéticos del extracto enzimático "*Saccharomyces cerevisiae*" de la levadura de panadería.

#### **Indicador:**

- $V_{max}$
- $K_m$
- Temperatura óptima
- pH óptimo

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Ubicación**

El estudio se ejecutó en los laboratorios de Bioquímica y Farmacoquímica "Juan de Dios Guevara" M.B. José A. Yarleque Mujica, De la facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.

#### **3.2. Definición de población y muestra**

##### **3.2.1. Población**

Levadura de panadería

##### **3.2.2. Muestra**

Entre 100 ± 250 gramos de levadura de panadería.

##### **3.2.3. unidad experimental**

± 2100 mL del extracto enzimático que serán comprados en tiendas especializadas en repostería.

#### **3.3. Métodos instrumentales para la recolección de datos**

#### **3.4. procedimiento para la recolección de datos**

##### **3.4.1. Recolección de muestra**

Las muestras fueron adquiridas en tiendas especializadas en repostería (productos de panadería) en la región de Ayacucho – Huamanga.

##### **3.4.2. Aislamiento del enzima (*Saccharomyces cerevisiae*)**

La extracción se realizó mediante el método de disolución para ello, se utilizó 1 gramos de levadura seca liofilizada combinada con 200 mL de tampón acetato (tampón acetato al 0,1 M; de pH 5,0 al 0,5 M en NaCl), agitar constante por 15

minutos, se centrifugo y se tomó el sobrenadante como el extracto de levadura, lo cual se guardado en un frasco oscuro con tapa rosca a temperatura ambiente.<sup>39</sup>

#### **3.4.3. Ensayo 1, determinación de velocidad inicial**

Se preparó 6 secuencia de tubos: tendremos 1 blanco 5 problemas, para cada secuencia para la incubación del preparado indicado (Anexo 18) lo cual serán sometidas a 55 °C durante 0, 5; 10; 15; 20 y 30 minutos. transcurrido el periodo de incubación se tomaron 0,2 mL de cada secuencia de tubos y se le añadió 2 mL del reactivo DNS, luego se volvió a incubar a 100 °C durante 10 minutos. finalmente se enfrió y se leyó a 570 nm.

#### **3.4.4. Ensayo 2, determinación de la temperatura óptima**

Se preparó 7 secuencia de tubos: 1 blanco y 6 problemas. En cada tubo se utilizaron las mezclas preparadas (Anexo 19), lo cual se incubaron a 0, 25, 35, 45, 55, 65 y 75°C durante unos 15 min. Luego del tiempo transcurrido se tomaron 0.2 mL de la secuencia de tubo y se le añadirá 2,0 mL de DNS, luego se incubará a 100 °C por 10 minutos. Finalmente se enfrió y se leyó a 570 nm.

#### **3.4.5. Ensayo 3, determinar el pH óptimo**

se preparó 5 secuencia de tubos: 1 blanco y 4 problemas para los valores de pH. se preparó de acuerdo a lo indicado (Anexo 20), se preparó los tampones a 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 y 7,0 pH, para cada secuencia de tubos, luego se incubo a 55 °C por 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se tomaron 0,2 mL de la secuencia de tubo y se le añadió 2,0 mL de DNS, finalmente se incubo a 100 °C por 10 min. Se enfrió y se leyó a 570 nm.

#### **3.4.6. Ensayo 4, determinación de velocidad máxima y constante de Michaelis-Menten, mediante diagramas o gráficos de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee y Hanes-woolf**

se preparó 7 secuencia de tubos: 1 blanco y 6 problemas, en cada tubo se añadió azúcar a concentraciones diferentes de 2 – 100mM. Se realizó de acuerdo a la tabla (Anexo 21), se incubo a 55 °C por 15 minutos. Luego del tiempo transcurrido se tomaron 0,2 mL de la secuencia de tubos y se añadió 2,0 mL de DNS. Luego se incubó a 100 °C por 10 minutos. Se enfrió y se leyó a 570 nm.

### **3.5. Alcance de la investigación**

El alcance de la investigación es experimental

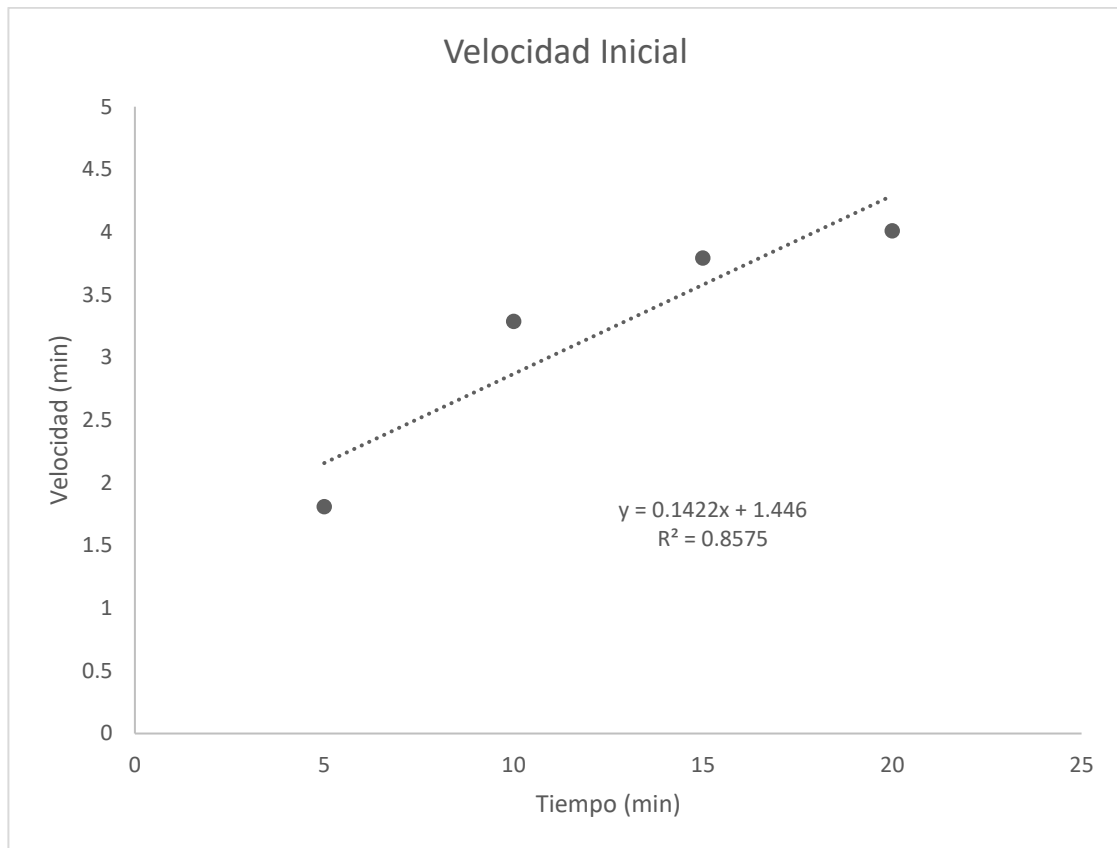
### **3.6. Diseño experimental**

Diseño de investigación experimental, para la determinación cinética de la enzima "*Saccharomyces cerevisiae*" de la levadura de panadería.

### **3.7. Análisis de datos**

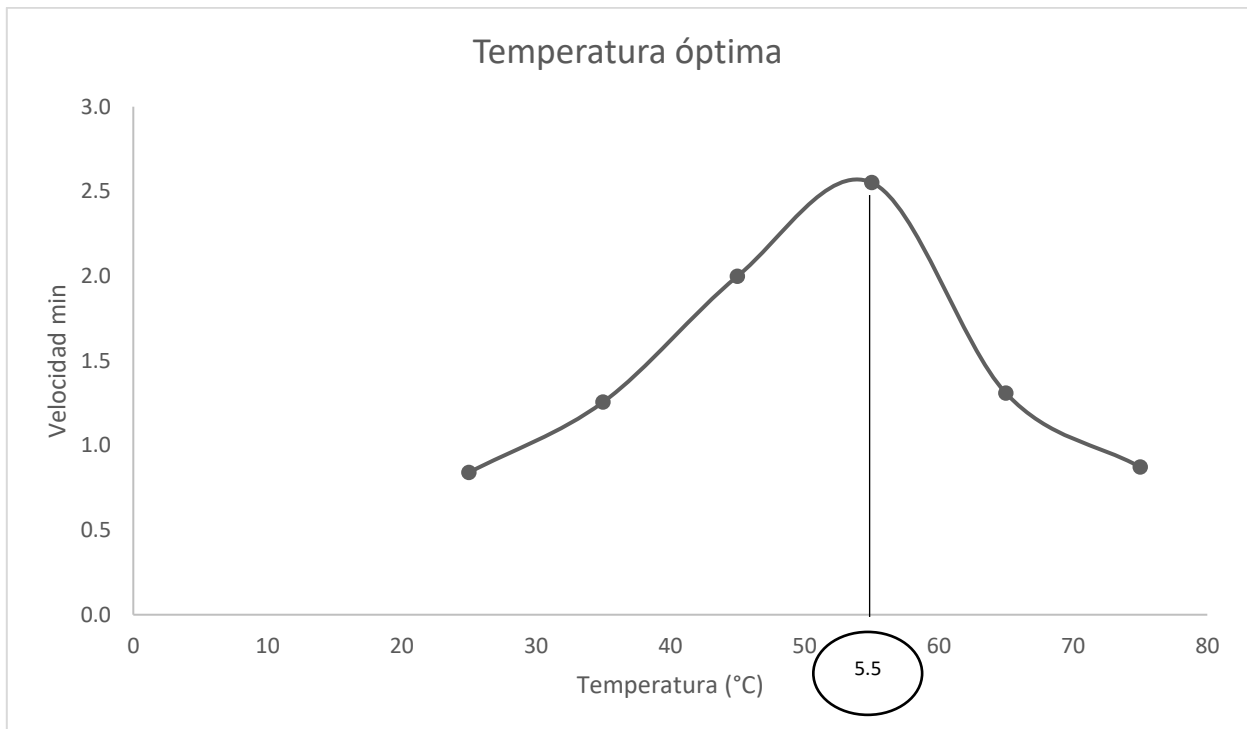
Los datos obtenidos fueron presentarán en forma de figuras de dispersión, usando el programa Excel versión 2019. Se determinó las medias y desviación estándar.

#### **IV. RESULTADOS**

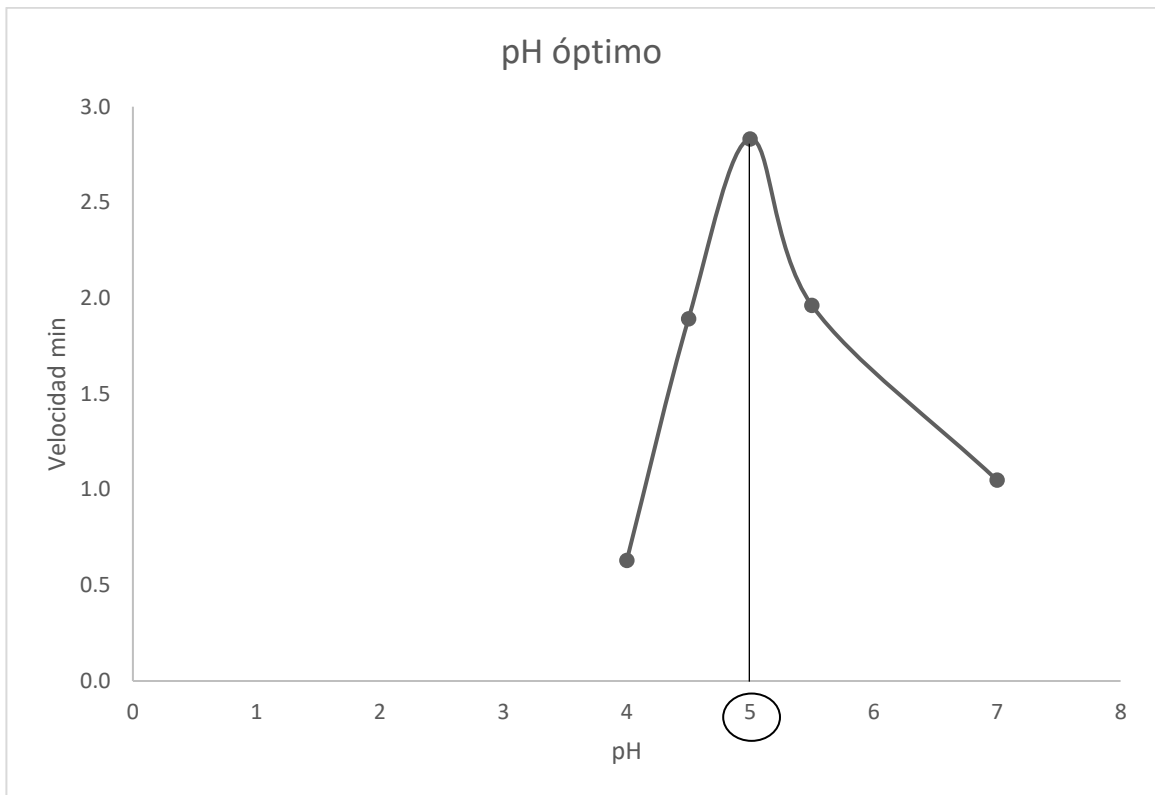


Nota: curva de calibración del extracto enzimático *Saccharomyces cerevisiae* ( $y=0.1422x + 1.446$ )

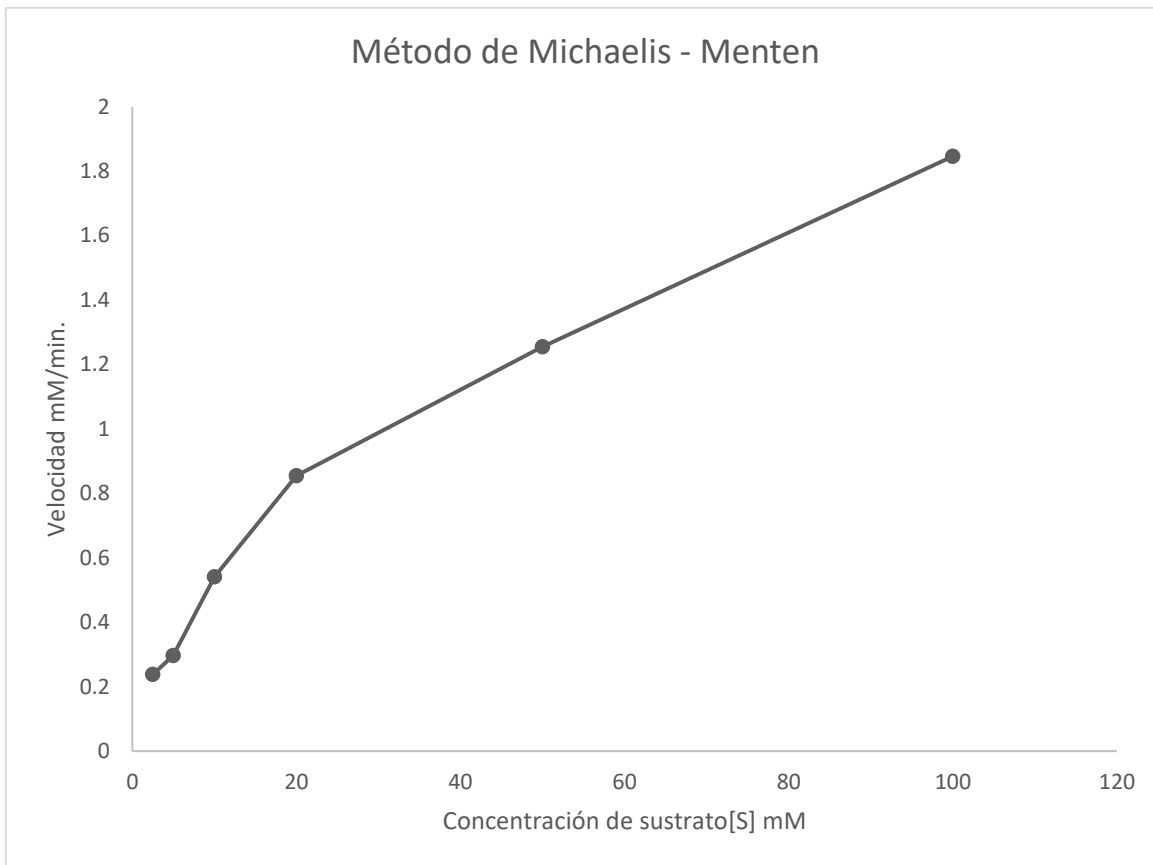
**Figura 1.** Efecto de la velocidad inicial con respecto al programa Excel 2019, del extracto enzimático de la levadura de *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figura 2.** Temperatura óptima de acuerdo al Excel 2019, del extracto enzimático *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.

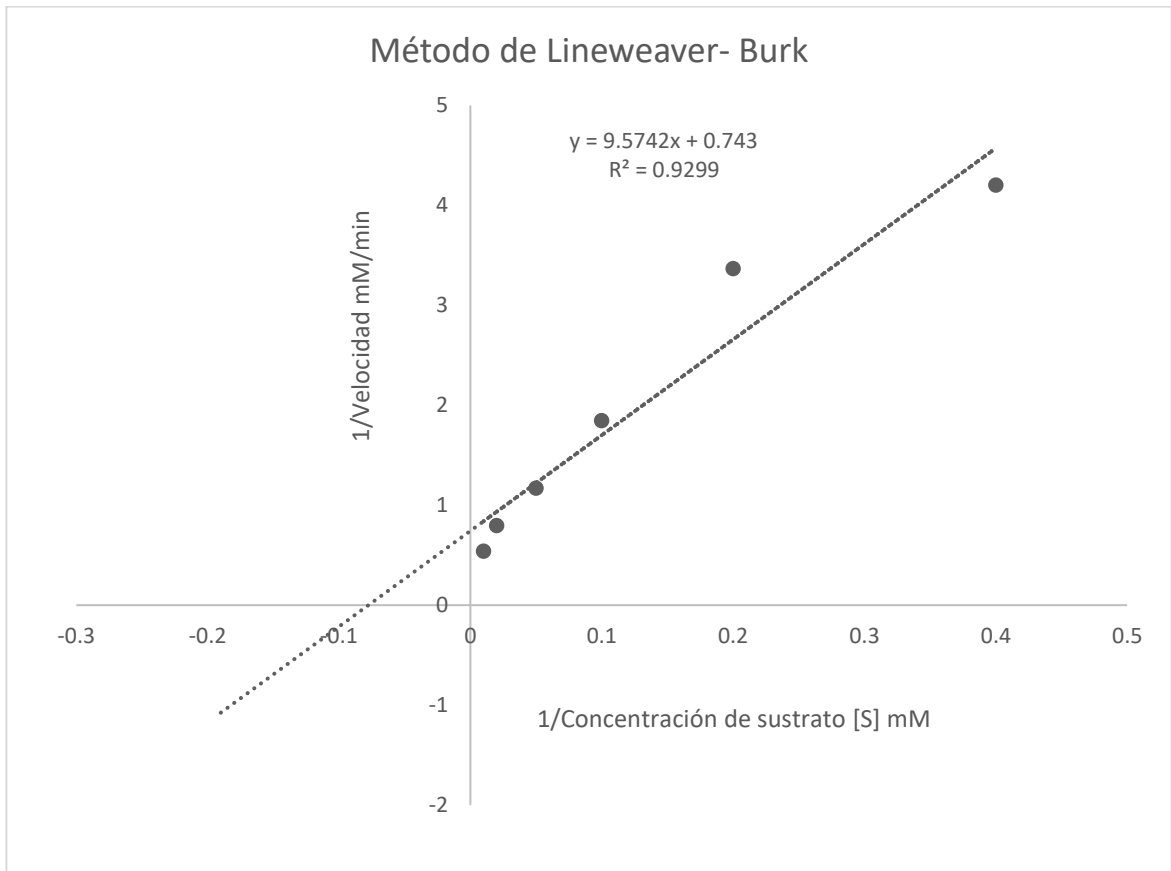


**Figura 3.** Efecto del pH sobre la actividad enzimática *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.



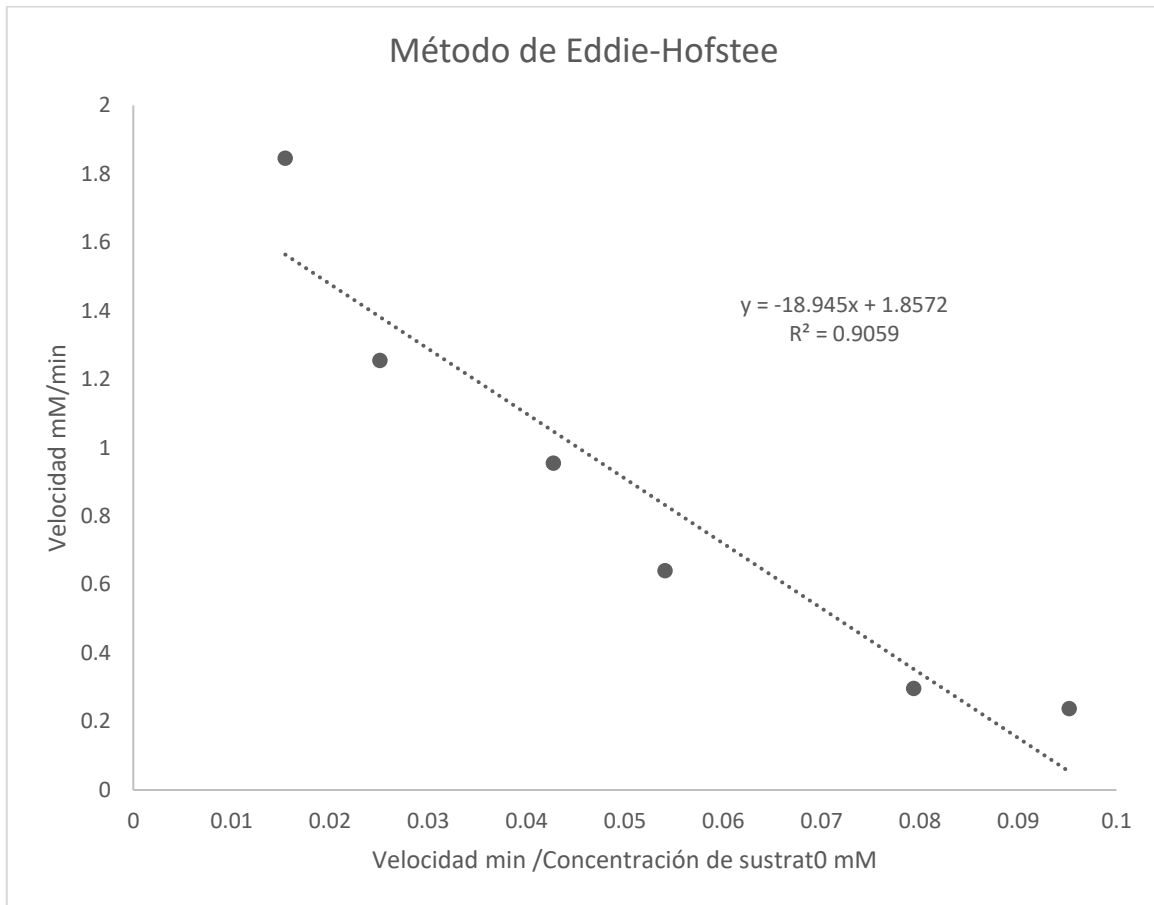
Nota: prueba de la concentración (2,5; 5; 10; 20; 50; 100 mM) de sustrato del extracto enzimático *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura seca de panadería.

**Figura 4.** Representación gráfica del método de Michaelis-Menten del extracto enzimática de *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.

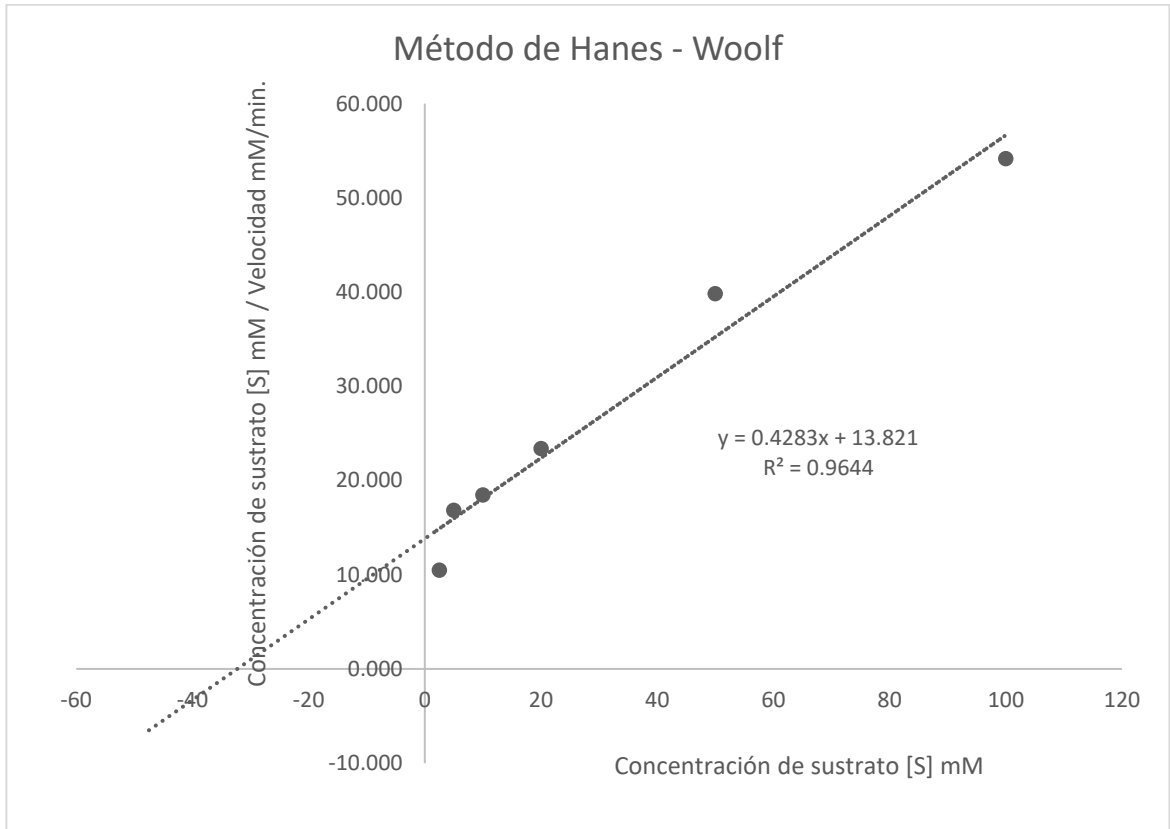


Nota: prueba de la concentración (2,5; 5; 10; 20; 50; 100 mM) de sustrato del extracto enzimático *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura seca de panadería.

**Figura 5.** Representación gráfica del método de Lineweaver-Burk del extracto enzimático *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.



**Figura 6.** representación gráfica de Eddie-Hofstee Absorbancia/Concentración de sustrato [S] vs Absorbancia, del extracto enzimático de *Saccharomyces Cerevisiae* de la levadura de panadería.



**Figura 7.** representación gráfica de Hanes-Woolf Concentración de Sustrato [S] vs Concentración de Sustrato [S]/Absorbancia, del extracto enzimático de *Saccharomyces Cerevisiae* de la levadura de panadería.

**Tabla 2** Resultados de los gráficos de los métodos de obtención

	$y$	$R^2$	$V_0$ (mM/min)	$V_{max}$ (mM/min)	$K_m$ (mM)
Velocidad inicial	0.1422x + 1.446	0.8575	0.1422		
Temperatura (°C)	55°C				
pH	5				
Michaelis Menten			1.634	1.846	26
Lineweaver Burk	9.5742x + 0.743	0.9299	1.265	1.346	12.886
Eddie Hofstee	-18.945x+1.8572	0.9059	1.696	1.8572	18.945
Hanes Woolf	0.4283x + 13.821	0.9644	2.011	2.335	32.269

## V. DISCUSIÓN

La *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos más estudiados y distribuido comercialmente.<sup>13</sup> Por ello la investigación tuvo como objetivo estimar los parámetros cinéticos del extracto liofilizado de la enzima “*Saccharomyces cerevisiae*” de la levadura de panadería, los cuales fueron adquiridos en tiendas de repostería y tiendas especializados en pastelería y panadería en ciudad de Huamanga - Ayacucho. El reconocimiento de la enzima se ha realizado en la levadura seca de *Saccharomyces cerevisiae*. Se obtuvo el extracto enzimático empleando como solvente el tampón acetato a temperatura ambiente, por lo cual se evaluó algunos parámetros cinéticos, como la temperatura óptima, pH óptimo, velocidad inicial ( $V_0$ ), velocidad máxima ( $V_{max}$ ) y constante de Michaelis ( $K_m$ ), se evaluó mediante el método colorimétrica también conocido como método DNS (Miller G. 1959).

En la figura 1, se presenta en el gráfico de tiempo vs absorbancia del extracto enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería, para determinar la velocidad inicial ( $V_0$ ), se utilizó el programa Microsoft Excel 2019, el resultado obtenido es similar con lo reportado por vera.<sup>17</sup>

La rapidez de una reacción necesita de una secuencia de factores tales como las concentraciones de moléculas, a presencia o ausencia de catalizadores. La velocidad de reacción se puede determinar, mediante la cantidad de sustancia que va a reaccionar y se va a producir en una unidad de tiempo. Lo cual puede ser muy corta, puesto de otra manera se produce un error considerable, sobre todo en los casos que la enzima pueda degradarse por algún producto de la reacción. Básicamente la velocidad de reacción es función de la concentración de una o más sustancias

presentes. Está representado por una orden de reacción,<sup>37</sup> estos son algunos ejemplos de velocidad de reacción química. Hay muchos enzimas que poseen excelentes propiedades de reacción química a temperatura y pH óptimo que favorecen su actividad enzimática.

Del ensayo realizado de velocidad inicial, del extracto liofilizado de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de panadería presentó un valor de  $V_0 = 0.1422$  Mm/min y un  $R^2$  de 0,86 del extracto (Figura 1) calculando la curva de calibración de la levadura ( $Y = 0.4283X + 13.821$ ) (Anexo 13). La velocidad inicial está por encima a lo reportado por Diosa J. quien dio resultados de velocidad inicial de  $1,05 \times 10^8 \pm 4,59 \times 10^6$  un resultado distinto.

La velocidad inicial fue determinada por el método de DNS (Miller G. 1959) es una técnica colorimétrica, y evaluándola a la concentración de 200 mM a longitud de onda de 570 nm.

En la figura 2, se presenta en el gráfico de temperatura vs velocidad del extracto enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería, para la determinación de la temperatura óptima, también se utilizó programa Microsoft Excel 2019, los resultados obtenidos son coherentes con lo reportado por Romero<sup>18</sup>, Oliver<sup>19</sup> y Micheo<sup>20</sup>.

Las reacciones químicas se caracterizan por tener una temperatura óptima, la cual podrían encontrarse comprendidas entre los 30 °C hasta 40 °C, se sabe que cuando el calor aumenta, la rapidez de reacción también, sin embargo, es propia de algunas enzimas. Un aumento de 10 °C puede duplicar o triplicar la rapidez de la reacción de una enzima. También es necesario tener en cuenta, que un aumento de calor puede acelerar la inactividad de la enzima por desnaturalización térmica. Muchas de las enzimas son susceptibles al calor por lo tanto es preferible usarlas en un rango de 40 °C hasta 80 °C por 2 hasta 5 min, con la finalidad de acabar con su función,<sup>38</sup> también la temperatura elevada afectaría en la unión de E-S, ocasionando desdoblamiento del complejo. Pocos organismos o procesos bioquímicos pueden resistir temperaturas por encima de 50 °C por largo tiempo, esto resulta de cambios irreversibles estructurales que alteran los mecanismos o disminuyen los organismos. Procesos como la coagulación de la proteína de albumina de huevo que sucede durante el cocimiento, es aún más rápida a altas temperaturas, sin embargo, si una proteína se desnaturaliza primero cuidadosamente ella se puede renaturalizar rápidamente a

bajas temperaturas,<sup>37</sup> este parámetro cinético es muy importante de conocer debido a que cada enzima posee diferentes propiedades, los cuales permiten que alcancen su máxima velocidad de reacción y mejor actividad enzimática.

Del ensayo realizado sobre el extracto liofilizado de la enzima de *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería presentó una temperatura óptima de 55 °C del extracto liofilizado (Figura 2) calculado a partir del gráfico tiempo vs absorbancia en el programa Microsoft Excel 2019 y en el papel milimétrico (Anexo 14). El contenido de la temperatura óptima es muy semejante a lo reportado por Romero<sup>18</sup>, quien registro un valor de temperatura óptima de 55 °C y Oliver<sup>19</sup>, quien reporto un valor aproximado de temperatura óptima termo estable de 55 °C y Micheo<sup>20</sup>, quien reporto un valor cercano a lo obtenido de temperatura de 50 °C

En la figura 3, se representa el gráfico de pH vs velocidad del extracto enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería, para la determinar el pH óptimo de la enzima invertasa, nos dio como resultado un pH de 5 lo cual concuerda con Placencia<sup>15</sup> y Oliver<sup>19</sup>.

La actividad enzimática se encuentra en una relación con su ión molecular, principalmente en la parte proteína, las series de polipeptídicas poseen cadenas que puedan ionizar como las cadenas de carboxilos y de aminos, dependiente del pH. El pH puede variar ampliamente, teniendo condiciones óptimas entre valores de 4 y 8. Las enzimas que se suministre a pHs extremos se desnaturizará.<sup>38</sup>

Mayormente las enzimas tienen un pH característicos en la cual son más activos. Algunos de los 20 aminoácidos de las series laterales participan en la catálisis. La mayor parte del enzima tienen pH característicos donde llegan a su máxima función por alto o bajo de su pH su actividad decae. Por efecto del pH sobre la velocidad de reacciones enzimáticas se aplica teniendo en cuenta que las enzimas son polielectrolitos que responden a cualquier cambio de pH. Como otras proteínas, el pH determina las especies iónicas del sustrato que predomina en los lugares activos del enzima, forman grupos ionizables que deben hallarse en forma iónica adecuada, con la finalidad de sostener la conformidad del lugar activo, es unir a los E-S. Un análisis completo de los efectos del pH puede ser muy compleja, especialmente si consideramos que muchos compuestos biológicos poseen múltiples grupos ionizables y que el sitio activo de una enzima puede poseer dos o más grupos ionizables y que el sitio activo es una enzima que pueden poseer dos o más, para que

se dé la unión o la catálisis del sustrato.<sup>37</sup> este parámetro cinético específico es muy importante de conocer debido a que este parámetro puede desnaturalizar o afectar los enlaces químicos adentro del lugar activo del enzima.

Del ensayo realizado del extracto liofilizado de la enzima *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería presento un pH óptimo de 5 del extracto liofilizado (Figura 3) calculado a partir del grafico pH vs velocidad en Excel 2019 y en el papel milimétrico (Anexo 15). El resultado del pH óptimo es muy semejante a lo reportado por Placencia<sup>15</sup>, quien reportó un valor de pH óptimo de 5, como también los estudios presentados por Oliver<sup>19</sup>, y Trujillo<sup>16</sup>.

En la figura 4 y figura 5 se representa en el gráfico de concentración vs velocidad del extracto enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería, lo cual se realizó por el método de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Eddie Hofsteen y Hanes Woolf obteniendo como resultado  $V_{max}$  (1.846, 1.346, 1.857, 2.335 mM/min) y  $K_m$  (26, 12.886, 18.945, 32.269 mM). podemos deducir que el  $V_{max}$   $1.3 \pm 2.335$  mM/min y el  $K_m$  oscilan entre  $12.8 \pm 32.3$  mM y un  $V_0$  esta entre  $0.14 \pm 2.011$  mM/min Los cuales son aproximados en la  $V_{max}$ , pero muy diferentes en las  $K_m$  con Placencia<sup>15</sup>, Federico<sup>21</sup> y Ara<sup>48</sup>.

Las ecuaciones más recordadas utilizadas en bioquímica se encuentran en el método de Leonor Michaelis y Maud Leonora Menten, que da origen la cinética enzimática y muchas reacciones. Una formulación matemática tan sencilla y práctica en la bioquímica que les dio a ellos un agradecimiento mundial. La ecuación menciona que la variación sufrida es por la rapidez de la reacción catalítica, al cambiar la concentración de sustrato. La unión entre el enzima y el sustrato da origen a un complejo. Leonor Michaelis nombre como constante de Michaelis ( $K_m$ ) que hay una relación entre enzima y sustrato. Menciona a la rapidez de reacción, quiere decir, que el número de sustrato y la enzima que reaccionan por unidad del tiempo, donde se alcanza la rapidez máxima de la reacción ( $V_{max}$ ).<sup>40</sup> Con lo que respecta con el método de Lineweaver Burk que se utiliza como instrumento para calcular y graficar los parámetros cinéticos. Es fácilmente representable y de dicho diagrama emana mucha información de interés en la bioquímica. Como por ejemplo el diagrama de Lineweaver-Burk permite identificar la  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) y  $V_{max}$  (velocidad máxima) el punto de corte con el eje de ordenadas es el valor  $-1/K_m$

así de sencillo. La representación de Lineweaver Burk tiene unas cuantas contrariedades puesto que al necesita de dobles inversos, surgen diminutos fallos en el ensayo, a mayores concentraciones el trazo se adherir al inicio del gráfico, de ahí se puede cálculos los errores, si los ensayos si se proyectan correctos puntos los resultados serán completamente verdaderas.<sup>40</sup> Este son algunas de ejemplos de las constantes de velocidades este tipo de parámetros cinéticos es muy importante de conocer la actividad de reacción más alto.

Del ensayo realizado del extracto liofilizado de la enzima *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería (Figura 4 y 5) presentó una velocidad máxima con respecto al método de Michaelis-Menten  $V_{max} = 1.846$  mM/min y  $K_m = 26$  mM (Anexo 16) y con respecto al método de Lineweaver-Burk  $V_{max} = 1.346$  mM/min y  $K_m = 12.886$  mM y  $R^2 = 0.9299$  ( $y = 9.5742X + 0.743$ ), Eddie Hofstee  $V_{max} = 1.857$  mM/min y  $K_m = 18.945$  ( $y = -18.945X + 1.8572$ ), Hanes Woolf  $V_{max} = 2.335$  mM/min y  $K_m = 32.269$  (Anexo 17). Los resultados obtenidos de los investigadores son un aproximados a lo reportado por Vera<sup>17</sup>,  $R^2 = 0,80$ , Federico<sup>21</sup>, ( $K_m = 20$  a  $25$  mM,  $V_{max} = 1,81$  a  $0,04$  umol/min/mg). Y Ara Itzel reporto un  $K_m = 38$  mM.

## VI. CONCLUSINES

1. La extracción de la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae* presentó una velocidad inicial  $V_0 = 0.0674 \pm 0.997$  mM/min.
2. El extracto liofilizado de la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae* alcanzó una temperatura óptima de 55 °C a una concentración de sustrato de 2000 mM respectivamente.
3. El extracto liofilizado de la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae* presentó un pH de 5,0 a una concentración de sustrato de 68.4 g/L respectivamente.
4. El resultado por el método de Michaelis-Menten  $V_{max} = 1.846$  mM/min,  $K_m = 26$  mM y  $V_0 = 1.634$  mM/min, Lineweaver-Burk que  $V_{max} = 1.346$  mM/ min,  $K_m = 12.886$  mM,  $V_0 = 1.265$  mM/min, y  $R^2 = 0.93$ , Eddie Hofstee  $V_{max} = 1.857$  mM/min,  $K_m = 18.945$  mM,  $V_0 = 1.696$  mM/min, y  $R^2 = 0.91$ , Hanes Woofs  $V_{max} = 2.335$  mM/min,  $K_m = 32.269$  mM y  $V_0 = 2.011$  mM/min y  $R^2 = 0.97$ , y una velocidad inicial  $V_0 = 0.1422$  mM/min, Se concluye indicando que la invertasa de levadura de panadería tiene mayor rendimiento a temperatura óptima 55°C y pH óptimo 5, con un mayor estabilidad, rendimiento y eficacia.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Optimizar el método de las reacciones enzimáticas, de tal forma que no se vea influenciada por la complejidad de la técnica, debido al uso de tiempos de reacción exactos y diversas temperaturas de trabajo, los cuales pueden variar los resultados si no se cumplen adecuadamente.
2. Evaluar los resultados con diferentes métodos de obtención de  $V_{max}$  y  $K_m$ .
3. Graficar los resultados obtenidos de la evaluación de los parámetros cinéticos utilizando papel milimétrico.
4. Continuar realizando más estudios sobre cinética enzimática, el cual es un campo de investigación que se está dejando de lado en nuestra casa de estudios.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nilsson, U., Öste, R., & Jägerstad, M. (1987). Cereal fructans: Hydrolysis by yeast invertase, in vitro and during fermentation. *Journal of Cereal Science*, 6(1), 53–60. doi:10.1016/s0733-5210(87)80040-1
2. Struyf, N., Laurent, J., Lefevere, B., Verspreet, J., Verstrepen, K.J., Courtin, C.M., 2017a. Establishing the relative importance of damaged starch and fructan as sources of fermentable sugars in wheat flour and whole meal bread dough fermentations. *Food Chem.* 218, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.004>.
3. Verspreet, J., Hemdane, S., Dornez, E., Cuyvers, S., Delcour, J.A., Courtin, C.M., 2013. Maximizing the concentrations of wheat grain fructans in bread by exploring strategies to prevent their yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)-mediated degradation. *J. Agric. Food Chem.* 61, 1397–1404. <https://doi.org/10.1021/jf3050846>.
4. Shi, Qiao. "Production of Single Cell Protein With Waste Liquid From Beet Molasses Alcohol Fermentation." *Food Science and Technology International* (2001): n. pag.
5. BAYRAMOGLU, G.; DOZ, T.; OZALP, V.C., ARICA, M. Y. Improvement stability and performance of invertase via immobilization on to silanized and polymer brush grafted magnetic nano particles **Food Chemistry**, Davis, 2017, v.221, n.1, p.1442-1450.
6. Guadix, A.; Guadix, E.; Páez, M.; González, P.; and Camacho, F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 2000, 41(1):7989. [https://www.researchgate.net/publication/236217209\\_Procesos\\_Tecnologicos\\_y\\_metodos\\_de\\_control\\_en\\_la\\_hidrolisis\\_de\\_proteinas](https://www.researchgate.net/publication/236217209_Procesos_Tecnologicos_y_metodos_de_control_en_la_hidrolisis_de_proteinas).
7. Rodriguez M. enzimas aplicadas en procesos industriales. (2014) Obtenidos de <http://www.revista.unam.mx/vo1.15/num12/art96>.
8. Jurado E. actividad enzimática, algunos factores que afectan la actividad enzimatica (2012) obtenido de <https://actividad-enzimatica-algunos-factores-que-afectan-la-actividad-enzimatica>.
9. Rebollado L. enzimas. (2006) [http://bibmed.ucla.edu/ve/edocs\\_bmucla/materialdidactico/celular/enzimas.pdf](http://bibmed.ucla.edu/ve/edocs_bmucla/materialdidactico/celular/enzimas.pdf)

10. Cantarella, L.; Alfani, F.; Cantarella, M.  $\beta$ -D-fructofuranoside fructohydrolase. In: Whitaker, J.R.; Voragen, A.G. J.; Wong (Ed.). **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003. p.787-804.
11. Bofo, D.C.S.; Castro, H.F; Medeiros, M.B. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana de açúcar. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, p.121-124, 2005. Número especial
12. Ashokkumar, B., N. Kayalvizhi and P. Gunasekaran. 2001. Optimization of media for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry* 37:331-338.
13. Falcón, C. (2018). Estudio de la actividad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en soportes naturales para la fermentación de cerveza. Tesis para optar el título de Ingeniero Agroindustrial. Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
14. Lincoln, L., & More, S. S. (2018). Purification and biochemical characterization of an extracellular  $\beta$ -d-fructofuranosidase from *Aspergillus sp. 3*. *Biotech*, 8(2), 86. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1109-2>
15. Placencia M. Santiago A. Pavon P. Vallejo V. Trajo S. Sosa A. Benitez C. Eugenia M. Efecto de la desglicosilacion sobre las propiedades de la invertasa termófila purificada de la levadura *Candida guilliermondii* MplIIa, bioquímica de procesos [internet]. 2014 [Citado 20 noviembre]; 49. 1480-1487. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.05.022>.
16. Trujillo R. Purificación y caracterización bioquímica de una  $\beta$ -fructofuranosidasa con actividad fructosiltransferasa producida por la levadura *Torulaspora delbrueckii*, posgrado interinstitucional [tesis] 2015[Citado el 8 noviembre 2022].
17. Vega M. Farias A. Peraca R. Ruiz W. Valmor V. Extracto optimizada y purificada y purificación parcial de invertasa aislada de *S. Cerevisiae* en puré de durazno”, brasilera de fruticultura [internet]; 2017[Citado 8 noviembre 2022];40 (2) <https://doi.org/10.1590/0100-29452018489>.
18. Romero G. Reyes J. hidrolisis de sacarosa por invertasa de *sacaronyces cervisiae* inmovilizada sobre nanoparticulas magnéticas de ferrita de cobalto, acta

- agronómica [internet]; 2019 [Citado 8 noviembre 2022]; 68: 115 – 125. <https://doi.org/10.15446/acag.v68n2.78340>.
19. Oliveira R. dos Santos V. da Silva M. Porto T. Kinetic/thermodynamic study of immobilized  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus tamarii* URM4634 in chitosan beads and application on invert sugar production in packed bed reactor. *Food Res Int.* 2020;137(September).
  20. Icheo M, determinación de las condiciones óptimas experimentales de un proceso de hidrólisis catalizada por la enzima invertasa en la producción de mieles invertidas de caña de azúcar a fin de obtener una miel de alta pureza a nivel laboratorio, [Trabajo de graduación de la Facultad de Ingeniería] Guatemala Universidad San Carlos de Guatemala, 2021.
  21. Federico M. Estudio de la actividad invertasa en mieles en el departamento de Cruz del eje (Córdoba) tratamiento térmico y posible adulteración, [Tesis de maestría en ciencias y tecnología de los alimentos] Córdoba, Argentina Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT) - Universidad Nacional de Córdoba - centro regional Córdoba 2021.
  22. WHO F. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, *Probiotics in food*[internet]; 2007 [Citado 8 noviembre 2022]; 85: 2-4 [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf).
  23. Mandels, M. Andreotti R, Medición de celulosa sacarificante. *Biotechnología. Bioing. Sínt.*[internet]; 1976 [Citado 8 noviembre 2022]; 6; 21-33.
  24. Ramirez J. Ayala M. Enzimas: ¿que son y cómo funcionan? *Revista digital universitaria* [internet]; 2014[Citado 8 noviembre 2022]; 15. ISSN 1607-6079. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193017672001>.
  25. Bairoch A. Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL[internet].200 [Citado 8 noviembre] 25, 31-36.
  26. Hernández, D.R. Efecto de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en consumo, digestibilidad y variables ruminales en borregos alimentados con pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) cosechado a dos intervalos de rebrote. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Posgraduados, Montecillo Méx.74 p. (1999).
  27. Querol, A. Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. *Int. Microbiol.* 6: 201-05. (2003).

28. Figueroa V. producción porcina con cultivos tropicales y reciclaje de nutrientes. Ed. Academia. La Habana. Cuba 1996 192 pp.
29. Boyle, R.J.; Roy, M.R.; Tang, M.L. Probiotic use in clinical practice: What are the risks? *Am. J. of Clin. Nutr.* 83: 1256-64. (2006).
30. Coenen, T.M. Safety evaluation of lactate enzyme preparation derived from *Kluyveromyces lactis*. *Food Chem. Toxicol.* 38: 671-77. (2000).
31. Garrido, N.; Santiesteban, C.M. Mosto concentrado de residuos alcohólicos. Manual de los Derivados de la Caña de Azúcar. ICIDCA. Tercera edición. Capítulo 6.2, pág.413 - 416. (2000).
32. Otero, M.A. Proteína unicelular para el consumo humano (Luis O. Galvez ed) Editorial Científico-Técnica, La Habana, Cuba (1989).
33. García, J; Suarez, M. A; Domenech, F.L; Blanco, G.C; Santiesteban, C.M. a Levadura *Saccharomyces*. Manual de los Derivados de la Caña de Azúcar. Tercera Edición. Capítulo 4.1, pág.197 -201. (2000).
34. Otero, M.A. Levaduras residuales. En: Las levaduras. Realidad y potencialidades (Otero, M.A ed) pp.87-98. <http://www.undp.org>. (2005).
35. Carlos Alberto Altamirano Cahuancama. Optimización de un Método para la Producción de Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapade Fermentación del Mosto de Cerveza, desde un nivel deLaboratorio a un nivel Piloto. Univ Nac Mayor San Marcos [Internet]. 2013; Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/552>
36. Sanchez A. la invertasa aplicación en la industria, microbiología industrial [internet]; 2015[Citado 8 noviembre 2022]; 4to cuatrimestre: 2-3.
37. José Alejandro Yarleque Mujica, BIOQUÍMICA cálculos y problemas, decano de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad San Cristóbal de Huamanga, primera edición, 2009.
38. Jonathan T. Aitkenhead's Textbook of Anesthesia, Journals & Books [internet]; 2019 [Citado 8 noviembre 2022]. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/enzyme-kinetics>.
39. Tena M, Jorrín J. Estudio cinético de la actividad de la invertasa de levadura. *Dep Bioquímica y Biol Mol* [Internet]. 2016;1–8. Disponible en:

CINETICA.pdf.

40. José L. Francisco G. los cuadro mosqueteros de la cinética enzimática, departamento de bioquímica y biología molecular A. Universidad de Murcia, revista Eubacteria, 2015.pdf.
41. Martínez L. Morales G. Caracterización cinética de la hidrólisis de sacarosa con invertasa libre e inmovilizada, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Proyecto de investigación para obtener el título de ingeniería Biotecnólogo, 2007, pdf.
42. Diestra J. Margarito L. Vega R. Castillo A. Modelación matemática del efecto de la temperatura en la actividad y la estabilidad térmica de la inulina de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y – 7571, Facultad de Ciencias Agropecuarias, revista Ciencias agropecuaria 2015.
43. Thomas M. Devlin, BIOQUÍMICA libro de texto con aplicación clínica España Barcelona, editorial Reverté, S.A., cuarta edición 2015.
44. Denise R. Ferrier, BIOQUÍMICA Lippincotts illustrated Reviews: Bioquímica, España Barcelona, 7ª. edición, 2017.
45. Aníbal R. Lodeiro, Catálisis enzimática fundamental química de la vida, Argentina, editorial de la Universidad de la plata, 1ª edición 2017.
46. Álvaro-Benito M, de Abreu M, Fernández-Arrojo L, Plou FJ, Jiménez-Barbero J, Ballesteros A, Polaina J, Fernández-Lobato M (2007) Characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. J Biotechnol 132:75-81.
47. Dipasquale L, Gambacorta A, Siciliano RA, Mazzeo MF, Lama L (2009) Purification and biochemical characterization of a native invertase from the hydrogen-producing *Thermotoga neapolitana* (DSM 4359). Extremophiles 13:345-354.
48. Ara Itzel Perez de los Santos Mondragón, expresión de las invertasas INVA e INVB *Zymomonas mobilis* en *Pichia pastoris*, bajo el control del promotor AOX1. Caracterización bioquímica e inmovilización de las enzimas recombinantes, tesis Mexico, 2016.

## **IX. ANEXOS**

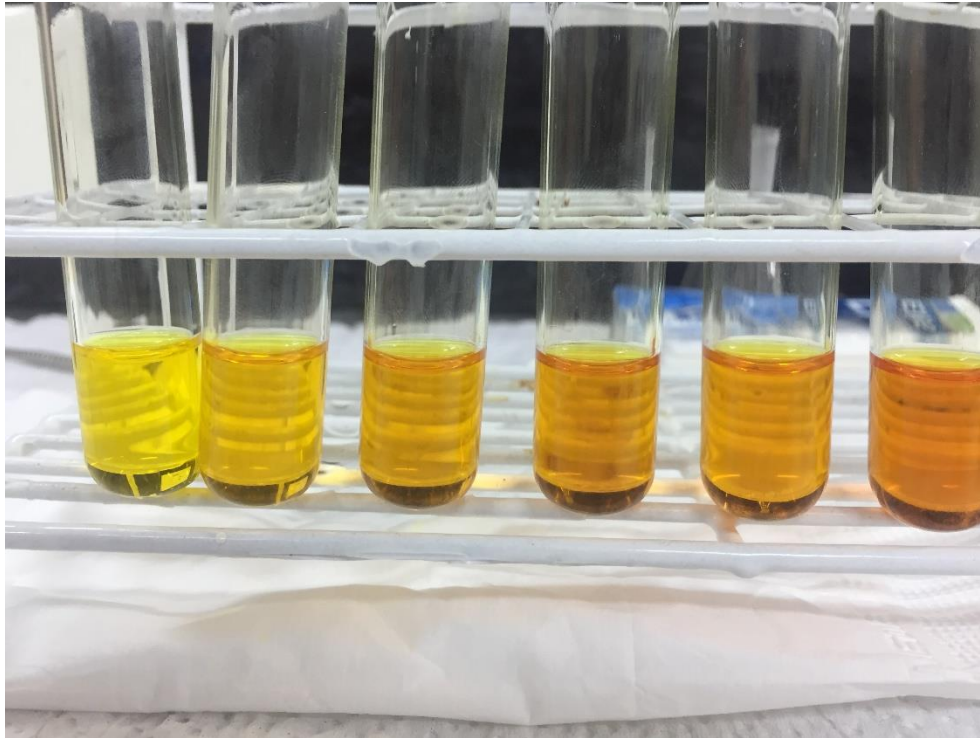
## Anexo 1

Equipo espectrofotómetro evolution 201 (Thermo scientific) del laboratorio de Bioquímica y Farmoquímica "Juan de Dios Guevara" M.B. José A. Yarleque Mujica.



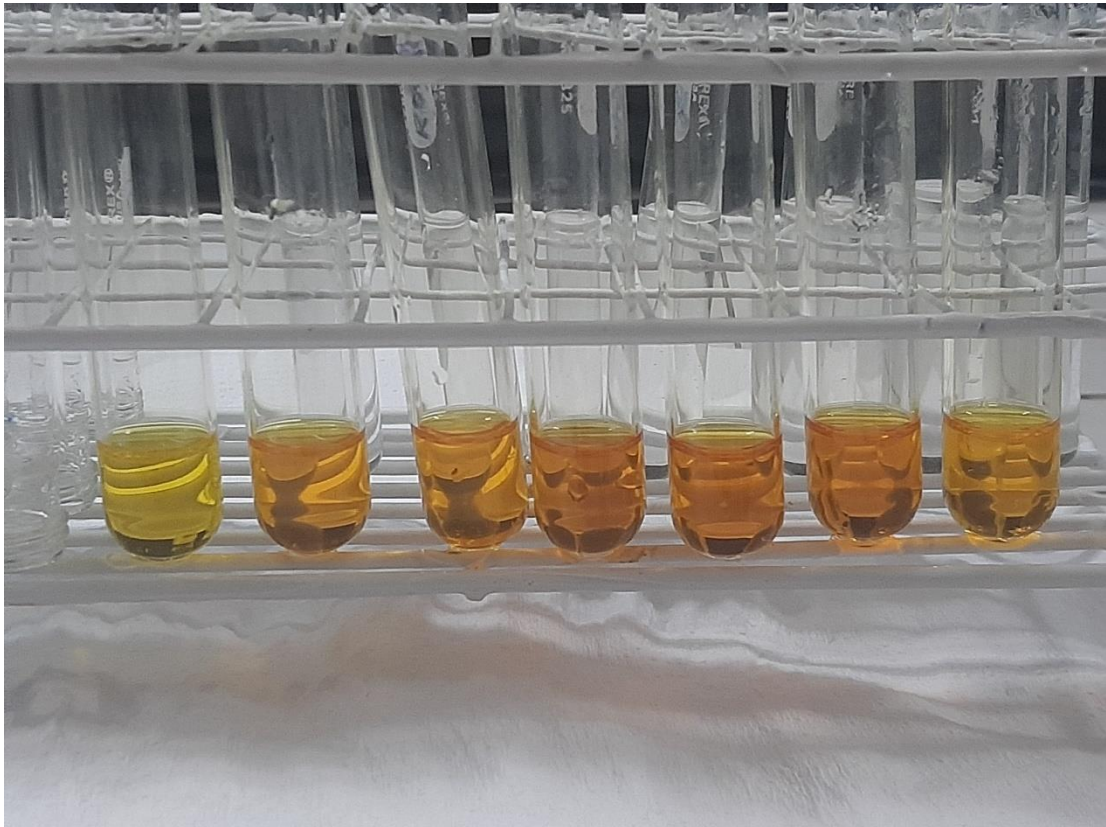
## Anexo 2

Resultados de las Pruebas para determinar la velocidad inicial del extracto enzimático *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.



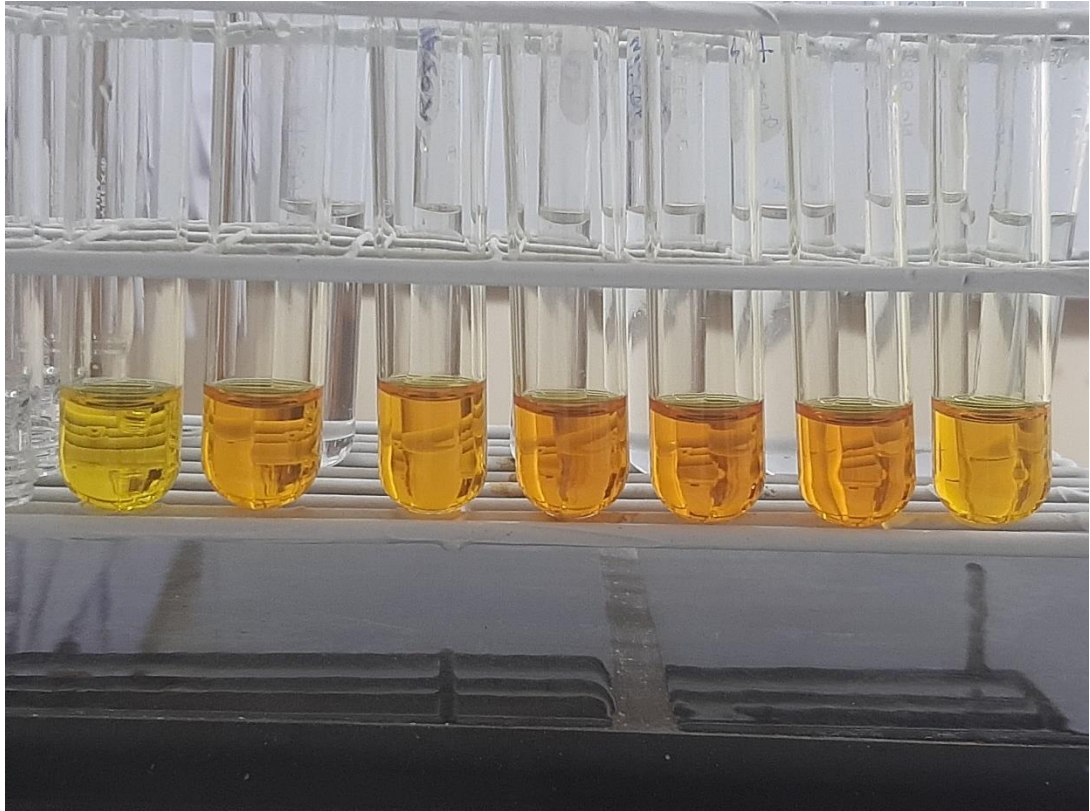
### Anexo 3

Resultados para determinar la temperatura óptima del extracto enzimático *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.



#### Anexo 4

Resultados para determinar la pH óptimo del extracto enzimático *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.



## Anexo 5

Pruebas sometidas a baño María (BM) del extracto enzimático *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.



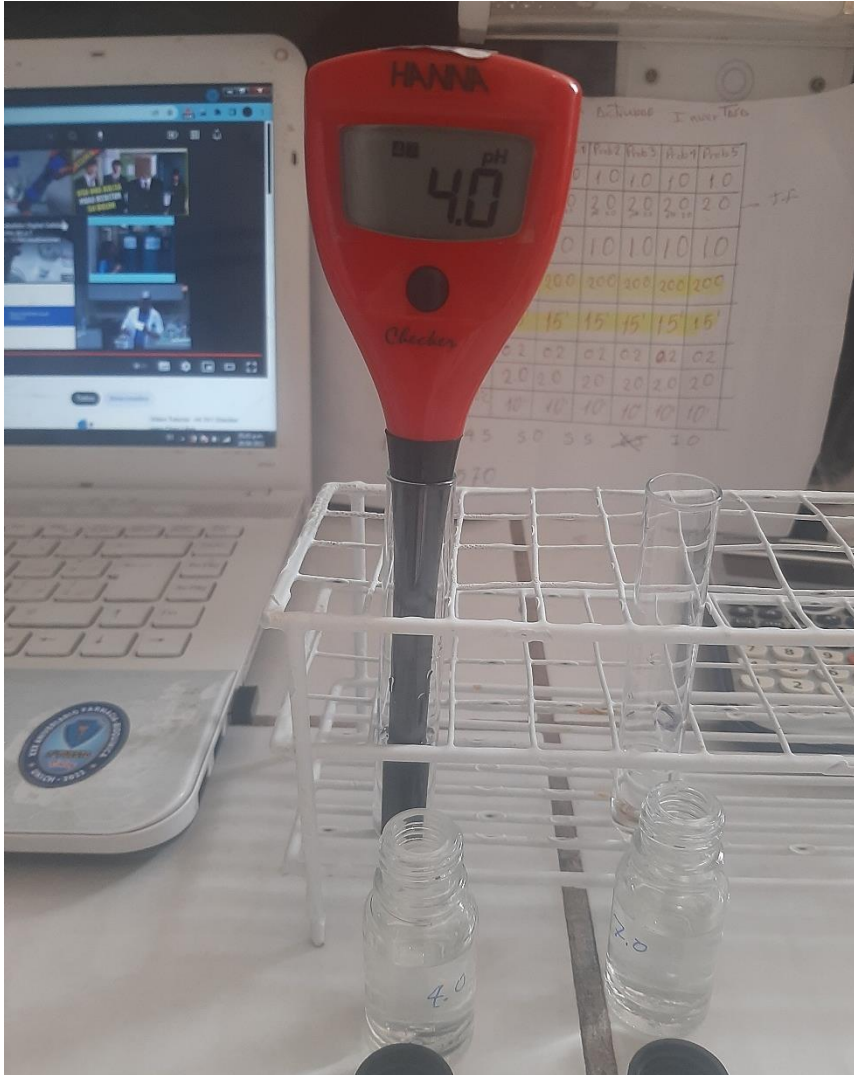
## Anexo 6

Pruebas sometidas a baño María (BM) a 100°C por medio de una cocinilla eléctrica de las pruebas realizadas del extracto enzimático *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.



## Anexo 7

Calibrando el pHmetro con sus buffers respectivos para realizar las pruebas realizadas del extracto enzimático *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.



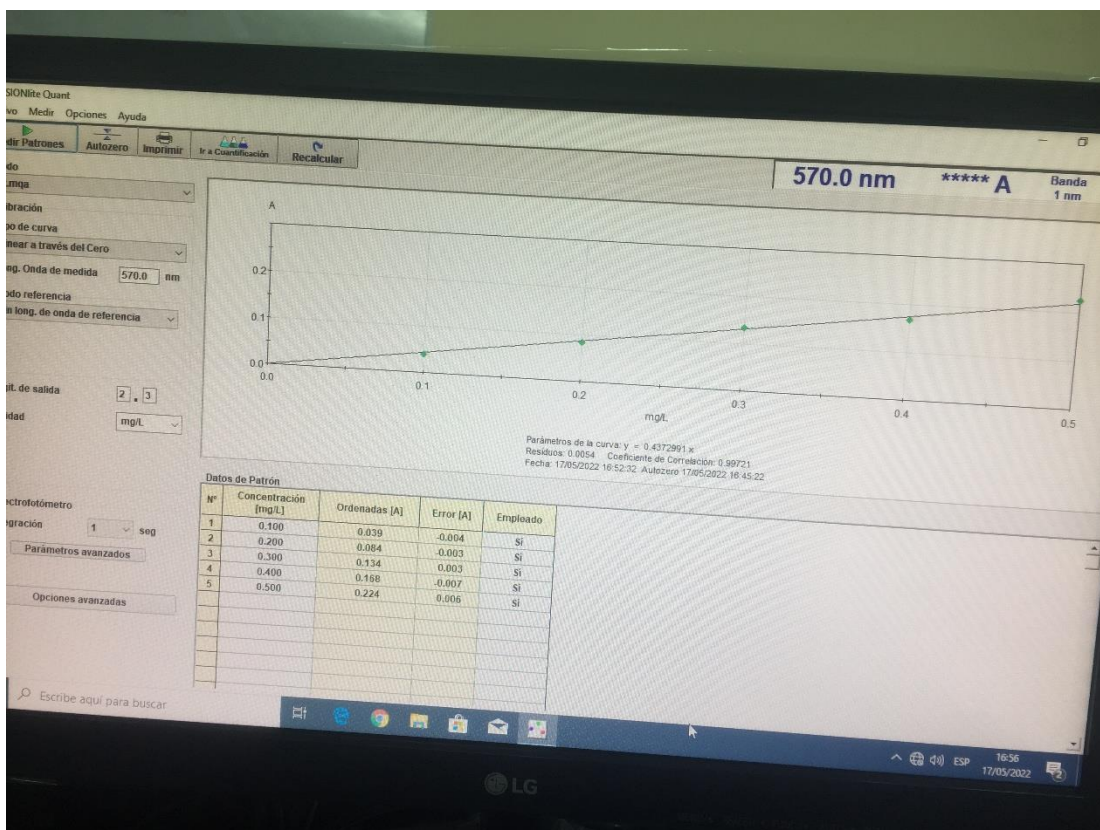
## Anexo 8

Diluciones consecutivas de la concentración de sustrato del extracto enzimático *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura de panadería.



## Anexo 9

Lectura de los resultados de la concentración de sustrato en el espectrofotómetro evolution 201 (Thermo scientific) del laboratorio de Bioquímica y Farmoquímica "Juan de Dios Guevara" M.B. José A. Yarleque Mujica, De la facultad de Ciencias de la Salud.



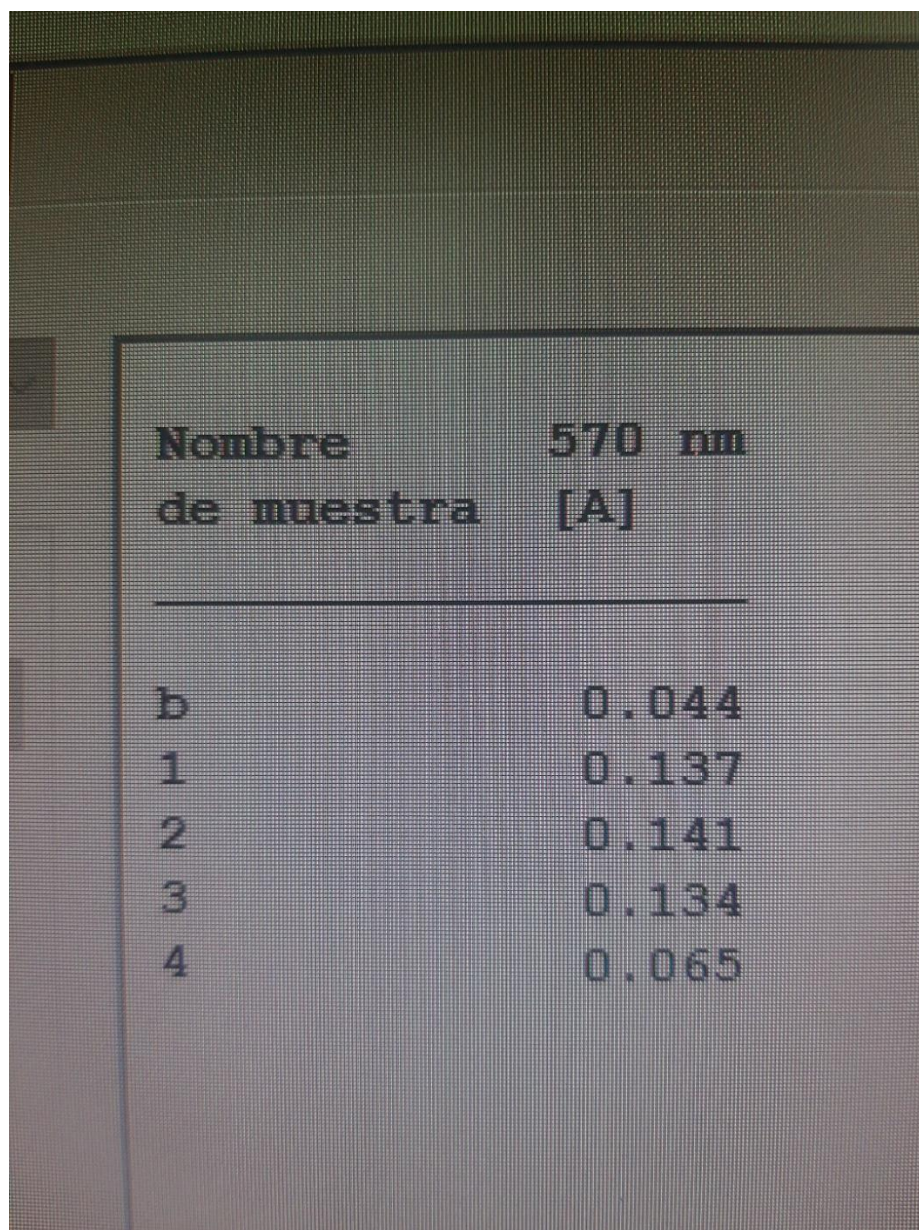
## Anexo 10

Lectura de los resultados de la temperatura óptimo en el espectrofotómetro evolution 201 (Thermo scientific) del laboratorio de Bioquímica y Farmoquímica "Juan de Dios Guevara" M.B. José A. Yarleque Mujica.

Nombre de muestra	570 nm [A]
1	0.078
2	0.088
3	0.138
4	0.145
5	0.130
6	0.071

### Anexo 11

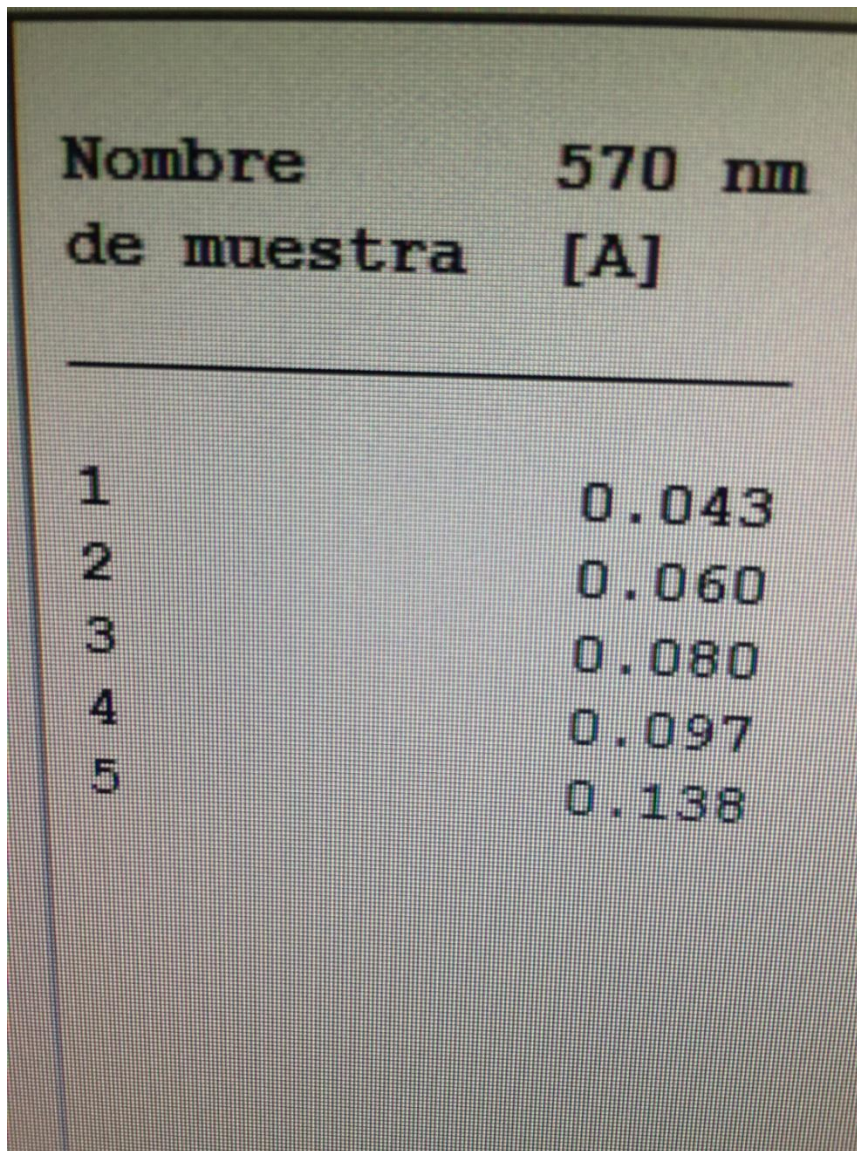
Lectura de los resultados de la pH óptimo en el espectrofotómetro evolution 201 (Thermo scientific) del laboratorio de Bioquímica y Farmoquímica "Juan de Dios Guevara" M.B. José A. Yarleque Mujica.



Nombre de muestra	570 nm [A]
b	0.044
1	0.137
2	0.141
3	0.134
4	0.065

### Anexo 12

Lectura de los resultados de la velocidad inicial en el espectrofotómetro evolución 201 (Thermo scientific) del laboratorio de Bioquímica y Farmoquímica "Juan de Dios Guevara" M.B. José A. Yarleque Mujica, De la facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.

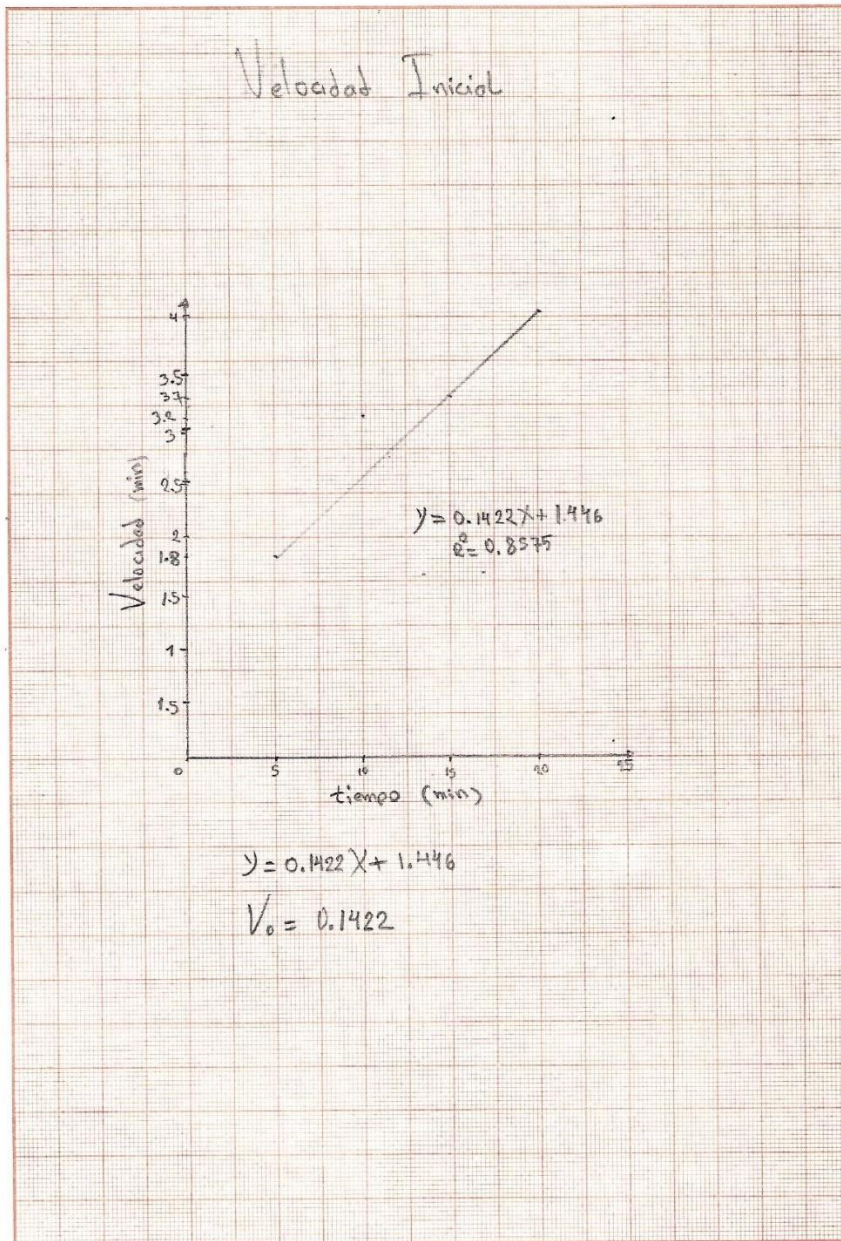


The image shows a digital display from a spectrophotometer. The display is divided into two columns. The left column is labeled 'Nombre de muestra' and contains the numbers 1 through 5. The right column is labeled '570 nm [A]' and contains absorbance values: 0.043, 0.060, 0.080, 0.097, and 0.138. A horizontal line separates the header information from the data rows.

Nombre de muestra	570 nm [A]
1	0.043
2	0.060
3	0.080
4	0.097
5	0.138

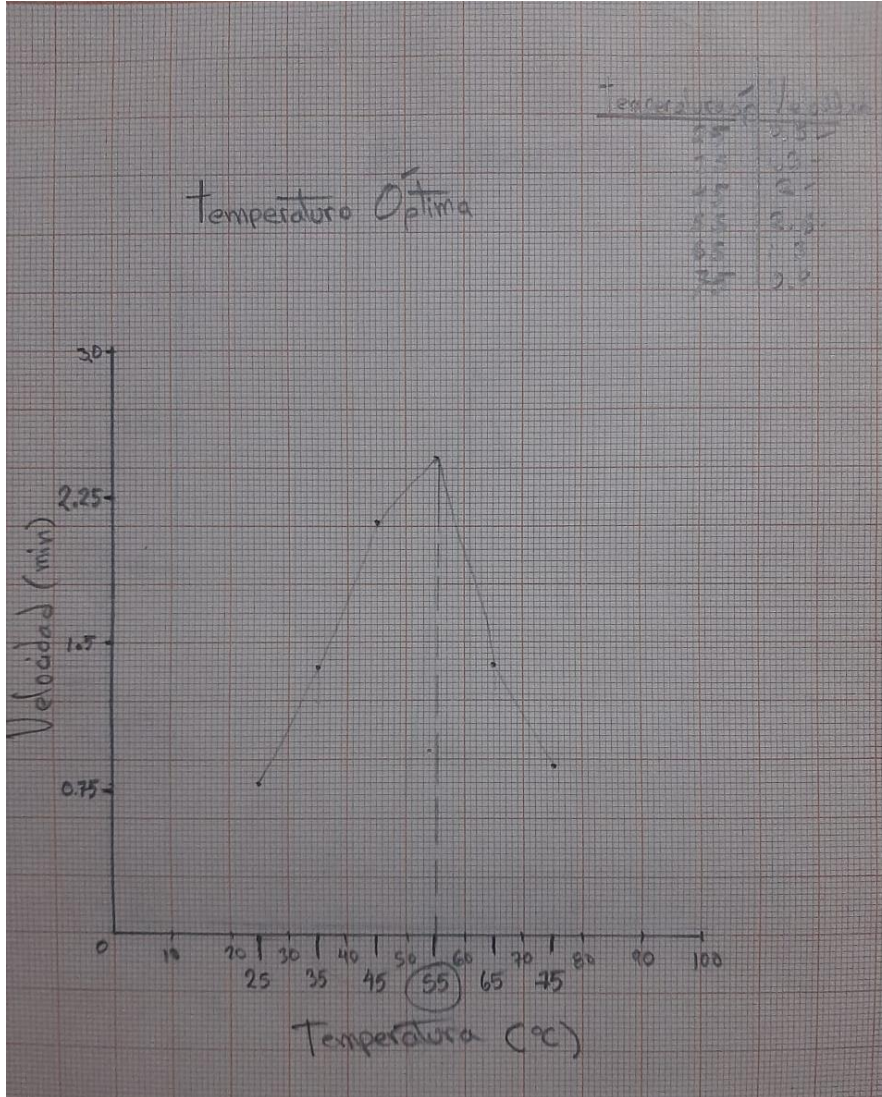
### Anexo 13

Grafica elaborado en papel milimétrico de la velocidad inicial.



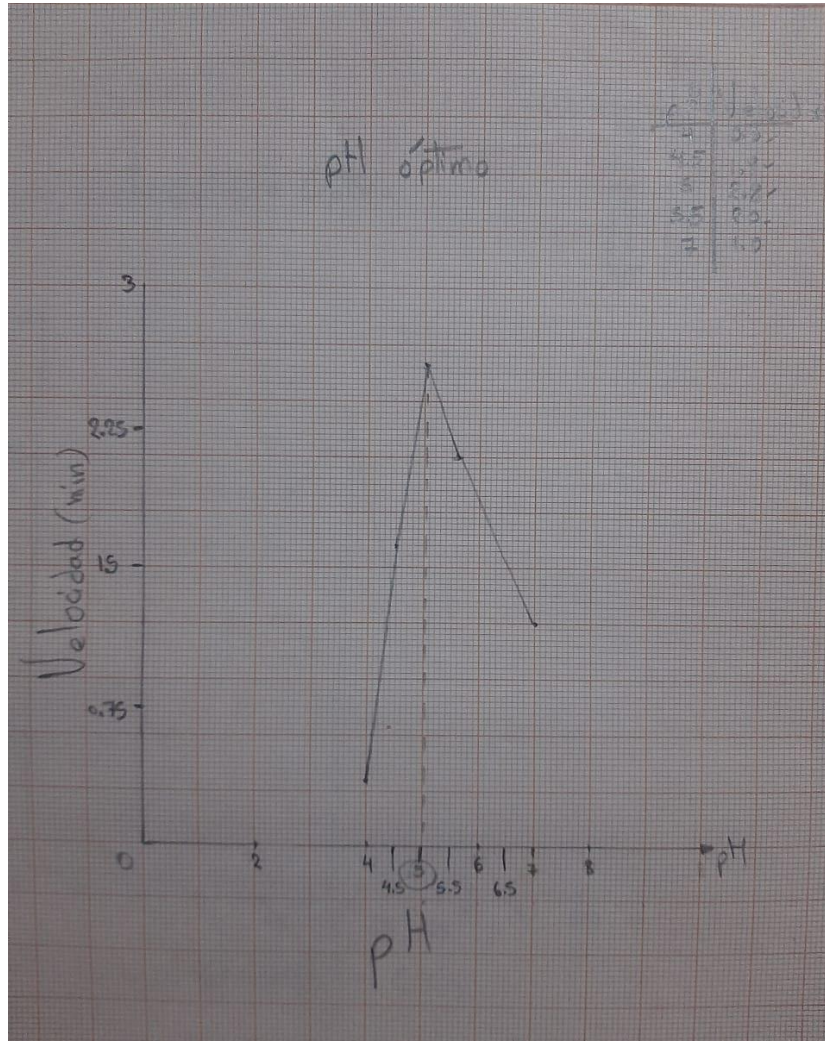
## Anexo 14

Grafica elaborado en papel milimétrico de la temperatura óptima.



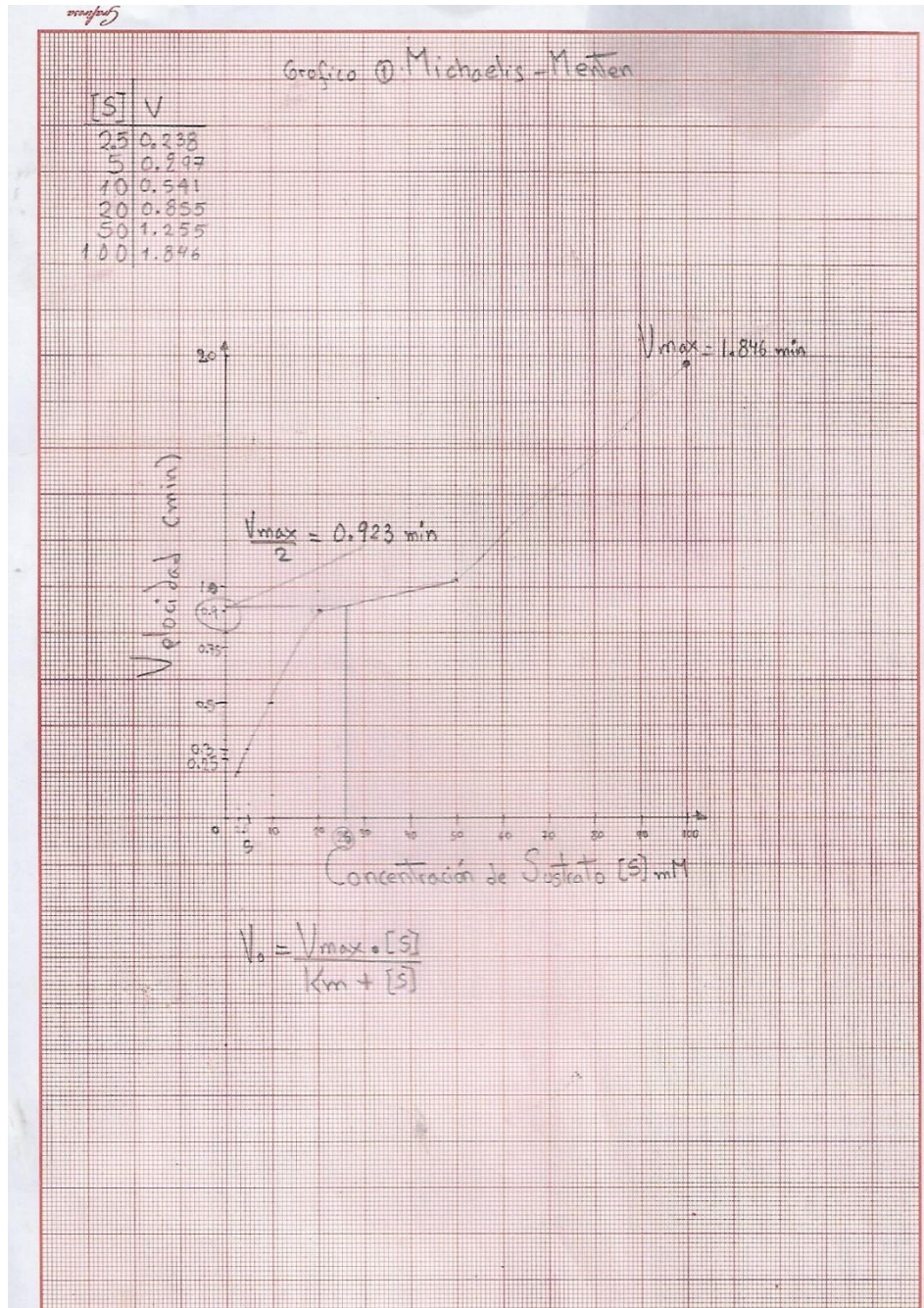
## Anexo 15

Grafica elaborado en papel milimétrico del pH óptimo.



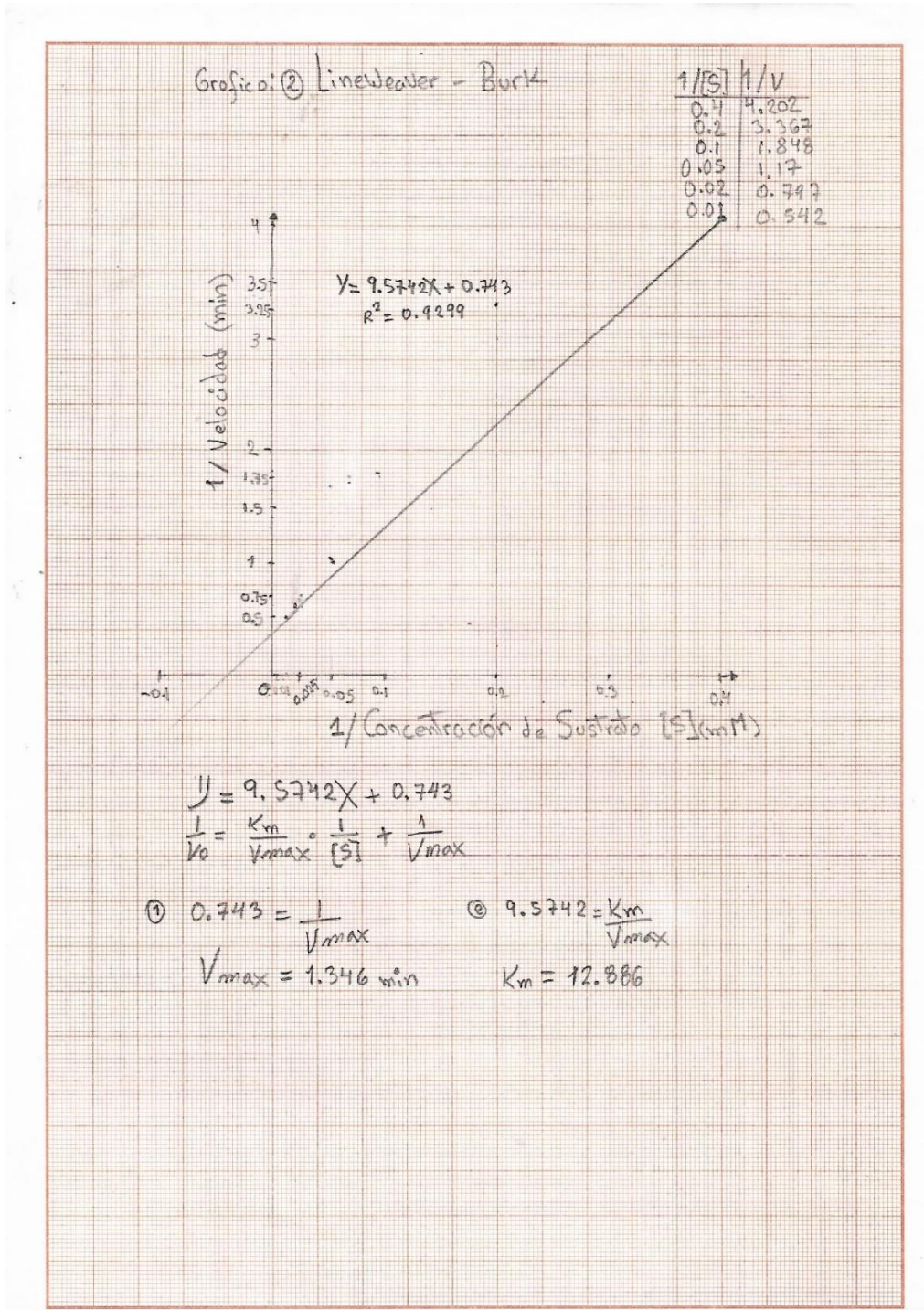
## Anexo 16

Grafica elaborado en papel milimétrico del método de Michaelis – Menten.



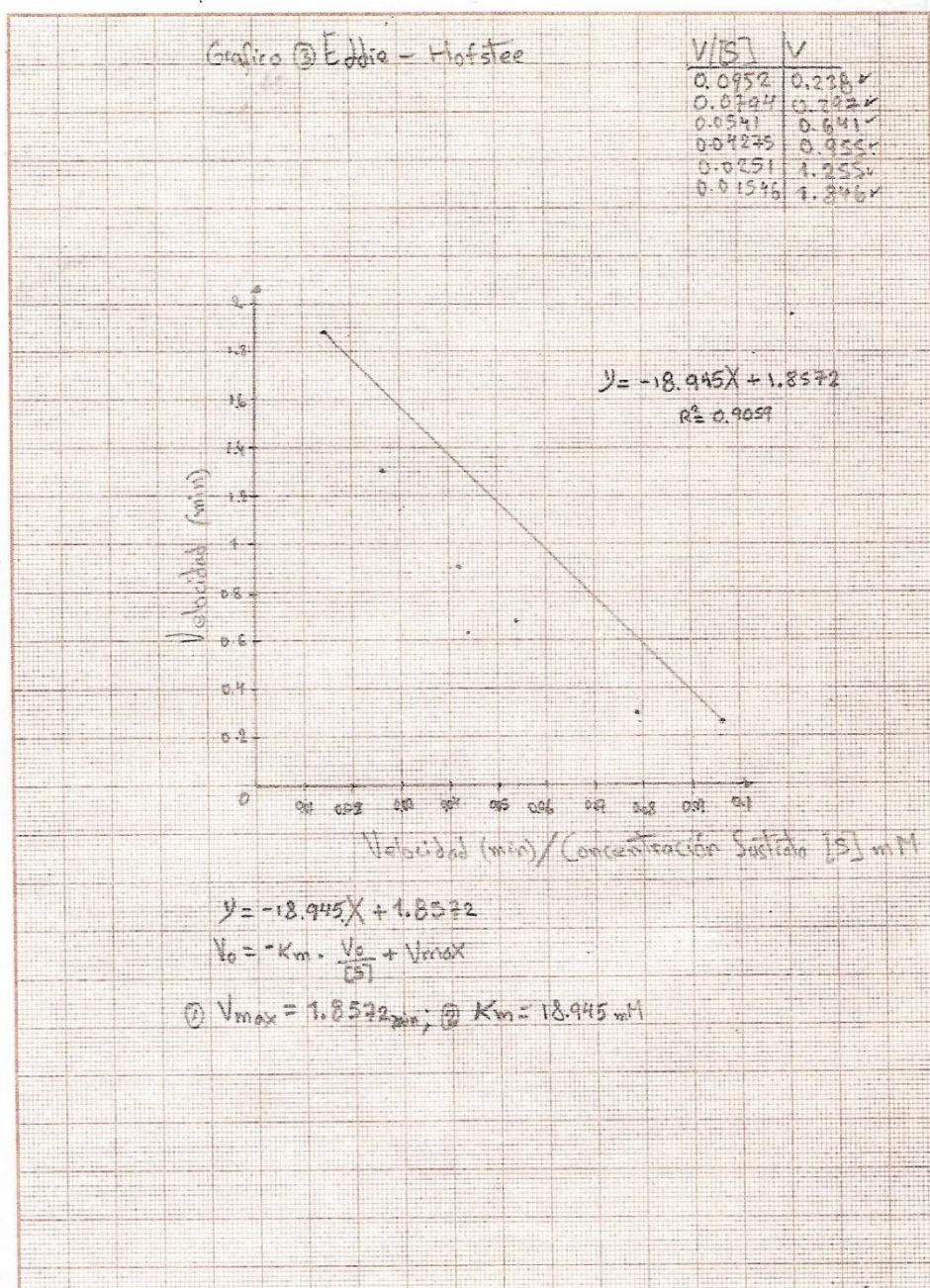
## Anexo 17

Grafica elaborado en papel milimétrico del método de Lineweaver – Burk.



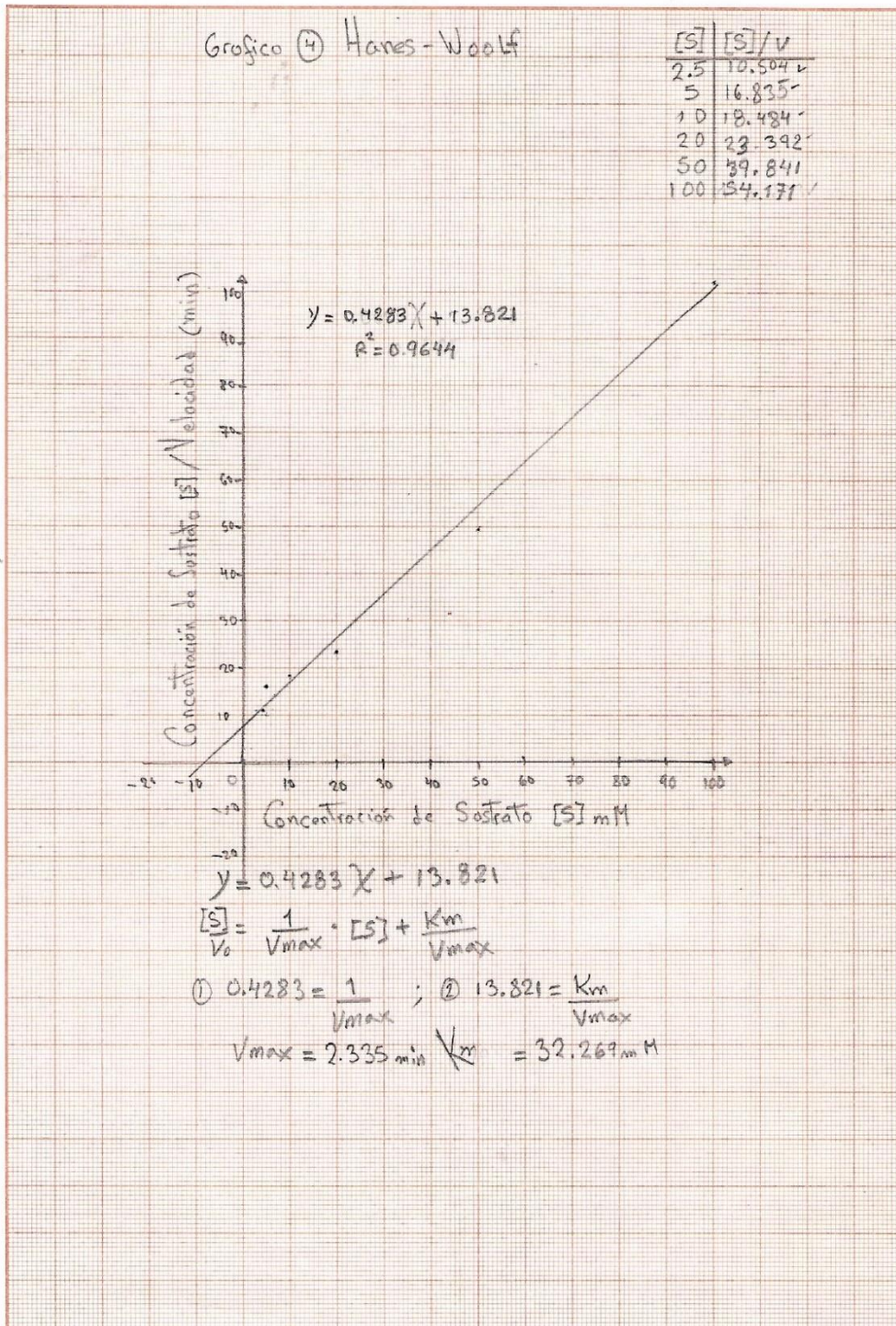
## Anexo 18

Grafica elaborado en papel milimétrico de la Eddie Hofstee



## Anexo 19

Grafica elaborado en papel milimétrico de la Hanes Woolf





## Anexo 21

### Ensayo 2, determinación de la temperatura óptima

Componentes	Blanco	Prob. 1	Prob. 2	Prob. 3	Prob. 4	Prob. 5	Prob. 6
Sacarosa 0,2 M (mL)	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tampón acetato 0,1 M (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Agua destilada (mL)	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Extracto enzimático (uL)	200	200	200	200	200	200	200
Incubar a diferentes temperaturas	0´	25´	35´	45´	55´	65´	75´
Mezclar (mL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
DNS (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Incubar a 100°C y enfriar ABS. a 570 nm				<b>10´</b>			

## Anexo 22

### Ensayo 3, determinar el pH óptimo

<b>Componentes</b>	<b>Blanco</b>	<b>Prob. 1</b>	<b>Prob. 2</b>	<b>Prob. 3</b>	<b>Prob. 4</b>
Sacarosa 0.2 M (mL)	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tampón acetato 0.1 M (mL) a diferentes pHs	2,0 pH 4,0	2,0 pH 4,5	2,0 pH 5,0	2,0 pH 5,5	2,0 pH 7,0
Agua destilada (mL)	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Extracto enzimático (uL)	200	200	200	200	200
Incubar a 55°C			15´		
Mezclar (mL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
DNS (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Incubar a 100°C y enfriar			10´		
ABS. a 570 nm					

### Anexo 23

Ensayo 4, determinación de la velocidad inicial, velocidad máxima y constante de Michaelis

<b>Componentes</b>	<b>blanco</b>	<b>prob. 1</b>	<b>prob. 2</b>	<b>prob. 3</b>	<b>prob. 4</b>	<b>prob. 5</b>	<b>prob. 6</b>
Sacarosa a diferentes concentraciones (mL)	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0
Tampón acetato 0.1 M (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
Agua destilada (mL)	1,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Extracto enzimático (uL)	200	200	200	200	200	200	200
Incubar a 55°C				15´			
Mezclar (mL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
DNS (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Incubar a 100°C y enfriar				<b>10´</b>			
ABS. a 570 nm							

## Anexo 24

Valores de absorbancia y desviación estándar de los parámetros cinéticos del extracto enzimático "*Saccharomyces cerevisiae*" de la levadura de panadería.

VELOCIDAD INICIAL								
Tiempos	Ensaio 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	Promedio	DS
5 min	0,035	0,026	0,041	0,039	0,030	0,077	0,0413	0,0184
10 min	0,073	0,056	0,188	0,059	0,059	0,205	0,1067	0,0700
15 min	0,093	0,078	0,285	0,101	0,089	0,325	0,1616	0,1119
20 min	0,122	0,112	0,409	0,123	0,118	0,452	0,2127	0,1616
30 min	0,185	0,132	0,540	0,177	0,177	0,560	0,2952	0,1984

TEMPERATURA ÓPTIMA								
temperaturas	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	Promedio	DS
25°C	0,066	0,053	0,032	0,043	0,075	0,054	0,0538	0,0154
35°C	0,102	0,107	0,050	0,083	0,087	0,077	0,0857	0,0203
45°C	0,173	0,190	0,102	0,087	0,137	0,166	0,1425	0,0412
55°C	0,222	0,223	0,189	0,161	0,144	0,170	0,1848	0,0325
65°C	0,121	0,053	0,091	0,094	0,102	0,077	0,0897	0,0231
75°C	0,109	0,044	0,042	0,047	0,068	0,028	0,0563	0,0288

## Anexo 25

Valores de absorbancia y desviación estándar de los parámetros cinéticos del extracto enzimático "*Saccharomyces cerevisiae*" de la levadura de panadería.  
(Continuación)

pH ÓPTIMO								
pH	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	Promedio	DS
4,0	0,036	0,036	0,038	0,037	0,042	0,037	0,0377	0,0023
4,5	0,110	0,137	0,141	0,140	0,143	0,135	0,1343	0,0123
5,0	0,125	0,153	0,165	0,161	0,163	0,470	0,2062	0,1301
5,5	0,112	0,137	0,153	0,146	0,154	0,136	0,1397	0,0156
7,0	0,059	0,066	0,071	0,066	0,076	0,081	0,0698	0,0079

CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO [S]								
[S] en (mM)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	Prome dio	DS
2,5	0,006	0,014	0,007	0,012	0,005	0,003	0,0078	0,0043
5	0,011	0,016	0,010	0,015	0,014	0,008	0,0123	0,0031
10	0,026	0,034	0,025	0,039	0,028	0,037	0,0310	0,0059
20	0,044	0,074	0,045	0,054	0,047	0,066	0,0550	0,0124
50	0,070	0,122	0,070	0,094	0,066	0,088	0,0850	0,0213
100	0,112	0,174	0,109	0,152	0,113	0,125	0,1308	0,0264

## Anexo 26

Prueba pos hoc Tukey: identificación que grupos son iguales o diferentes.

velocidad maxima	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Lineweaver Burk	6	14,82278		
Eddie Hofsteen	6	18,70283	18,70283	
Michaelaes Menten	6		25,00000	25,00000
Hanes Woolf	6			33,71450
Sig.		,706	,325	,104

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

### km HSD Tukeya

velocidad maxima	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Lineweaver Burk	6	1,56200	
Eddie Hofsteen	6	1,74717	
Michaelaes Menten	6	1,91150	1,91150
Hanes Woolf	6		2,48600
Sig.		,432	,084

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

## Anexo 27. Matriz de consistencia

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	VARIABLES	METODOLOGIA
Estimación de parámetros cinéticos de la actividad enzimático del extracto "Saccharomyces cerevisiae" la levadura de panadería.	¿Cuál será la temperatura óptima, pH óptimo, $K_m$ y $V_{max}$ del extracto enzimático "Saccharomyces cerevisiae" de la levadura de panadería?	<p><b>Objetivo General:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Estimar los parámetros cinéticos del extracto enzimático de la actividad "Saccharomyces cerevisiae" de levadura de panadería.</li> </ul> <p><b>Objetivos Específicos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar las velocidades iniciales, <math>K_m</math> y <math>V_{max}</math> del extracto enzimático "Saccharomyces cerevisiae" de la levadura de panadería.</li> <li>Determinar la temperatura óptima del extracto enzimático "Saccharomyces cerevisiae" de la levadura de panadería.</li> <li>Determinar el pH óptimo del extracto enzimático "Saccharomyces cerevisiae" de la levadura de panadería.</li> </ul>	<p>La invertasa (EC.3.2.1.26) pertenece a los glucósidos hidrolasas que catalizan la sacarosa (azúcar de mesa) en dos monosacáridos, es decir, glucosa y fructosa. Juega un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en las respuestas de defensa al estrés, La invertasa, también llamado beta – fructofuranosidasa que escinde los residuos terminales de beta – fructofuranosidasa no reductores, es una glicoproteína con un pH óptimo de 4,5 y estabilidad a 50°C. esta ampliamente distribuida en la biosfera, especialmente en plantas y microorganismo. Saccharomyces cerevisiae comúnmente llamado levadura de panadería es la principal cepa utilizada para la producción y purificación de la enzima. En la naturaleza existen en diferentes isoformas, en la levadura, está presente como invertasa extracelular o como invertasa intracelular. En las plantas, hay tres isoformas cada una de las cuales difiere en propiedades bioquímicas y ubicaciones subcelulares. La inversión en las plantas es esencial no solo para el metabolismo, sino que también ayuda en la osmorregulación, el desarrollo y el sistema de defensa. En los seres humanos, la enzima actúa como un refuerzo inmunológico, como un antioxidante, un antiséptico y, en algunos casos, es útil para los pacientes con cáncer de huesos o cáncer de estómago.</p>	<p><b>Variable (1)</b></p> <p>Parámetros cinética del extracto enzimático Saccharomyces cerevisiae.</p> <p><b>Indicadores:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><math>V_{max}</math>.</li> <li><math>K_m</math>.</li> <li>Temperatura</li> <li>pH</li> </ul>	<p><b>Nivel de Investigación básico:</b> experimental.</p> <p><b>Población:</b> la levadura de panadería, adquiridos en tiendas especialista en productos de panaderías de la ciudad de Ayacucho.</p> <p><b>Muestra</b> 250 gramos de levadura de panadería que fueron adquiridos en tiendas de repostería del departamento de Ayacucho.</p> <p><b>Modelos experimentales:</b> Las pruebas se realizarán de acuerdo a los protocolos dados en los cuadros, lo cual serán leídas por el espectrómetro UV/VIS a 570 nm, y los resultados serán expresados en gráficas y se harán los cálculos correspondientes.</p> <p><b>Diseño experimental:</b> Básico experimental.</p> <p><b>Análisis estadístico</b> Se construirán gráficos de los datos obtenidos del espectrofotómetro UV/VIS.</p>

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

### RESOLUCIÓN DECANAL N° 1382- 2024-UNSCH-FCSA-D

**BACHILLER: Julio Cesar YARANGA MENDOZA**

En la ciudad de Ayacucho, siendo las nueve y diez de la mañana del día trece del mes de diciembre del año dos mil veinticuatro, se reunieron en el auditorium de la Facultad de Ciencias de la Salud los docentes miembros del jurado evaluador, para el acto de sustentación del trabajo de tesis titulado **Estimación de parámetros cinéticos de la actividad enzimática del extracto "Saccharomyces cerevisiae" de la levadura de panadería.** presentado por **Julio Cesar YARANGA MENDOZA**, para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. El jurado evaluador está conformado por:

Presidente (Decano) : Prof. Edgar Cárdenas Landeo (delegado por el Decano)  
Jurados : Prof. Marco R. Aronés Jara  
: Prof. Kirianova Godoy Bautista  
4to jurado : Prof. Cinthia Gavilan Zamora  
Asesor : Prof. José A. Yarlequé Mujica  
Secretario Docente : Prof. Daniel Santiago Chavez

Con el quorum de reglamento se dio inicio a la sustentación de tesis, el presidente de la comisión pide al secretario docente dar lectura a los documentos presentados por el recurrente, resolución decanal y algunas indicaciones al sustentante.

Da inicio la exposición el Bachiller: **Julio Cesar YARANGA MENDOZA** y una vez concluida, el presidente de la comisión solicita a los miembros del jurado evaluador realizar sus respectivas preguntas, seguidamente se da pase al asesor de tesis, para que pueda aclarar algunas preguntas, interrogantes, aclaraciones.

El presidente invita al sustentante abandonar el auditorium para que pueda proceder con la calificación.

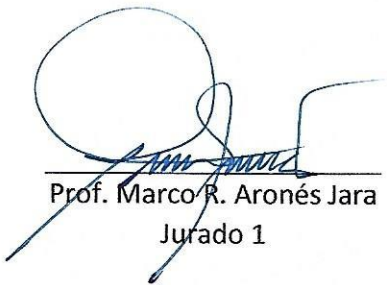
### RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FINAL

Bachiller: **Julio Cesar YARANGA MENDOZA**

JURADOS	Texto	Exposición	Preguntas	P. Final
Prof. Marco R. Aronés Jara	14	15	15	15
Prof. Kirianova Godoy Bautista	11	11	11	11
Prof. Cinthia Gavilan Zamora	14	15	15	15
<b>PROMEDIO FINAL</b>				14

De la evaluación realizada por los miembros del jurado calificador, llegaron al siguiente resultado: Aprobar al Bachiller: **Julio Cesar YARANGA MENDOZA**; quien obtuvo la nota final de catorce (14) para la cual los miembros del jurado evaluador firman al pie del

presente, siendo las 11:14 am de la mañana, se da por concluido el presente acto académico.



---

Prof. Marco R. Aronés Jara  
Jurado 1



---

Prof. Kirianova Godoy Bautista  
Jurado 2



---

Prof. Cinthia Gavilan Zamora  
4to Jurado



---

Prof. José A. Yañequé Mujica  
Asesor



---

Prof. Edgar Cárdenas Landeo  
Presidente



---

Prof. Daniel Santiago Chávez  
Secretario docente

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

El Instructor en Segunda Instancia, en virtud de la RCU N.° 039-2021-UNSCH-CU, y en calidad de director de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, emite la presente

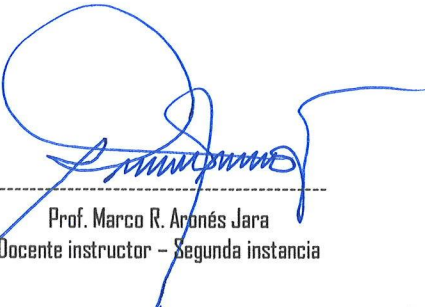
**CONSTANCIA**

**DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

A Julio Cesar YARANGA MENDOZA, Bachiller de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, en mérito a que la tesis titulada: Estimación de parámetros cinéticos de la actividad enzimática del extracto "*Saccharomyces cerevisiae*" de la levadura de panadería, ha alcanzado un índice de similitud de 10% (diez); cumpliendo satisfactoriamente lo establecido en el Art. 13 del Reglamento de Originalidad de Trabajos de investigación de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga mediante el uso del SOFTWARE TURNITIN.

En ese sentido, se emite la presente constancia en señal de conformidad.

Ayacucho, 23 de abril de 2025.



Prof. Marco R. Aronés Jara  
Docente instructor - Segunda instancia

# Estimación de parámetros cinéticos de la actividad enzimática del extracto “*Saccharomyces cerevisiae*” de la levadura de panadería.

*por* Julio Cesar Yaranga Mendoza

---

**Fecha de entrega:** 10-abr-2025 12:11p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2641602774

**Nombre del archivo:** Tesis\_de\_Julio\_Cesar\_Yaranga.pdf (4.97M)

**Total de palabras:** 12965

**Total de caracteres:** 64834

# Estimación de parámetros cinéticos de la actividad enzimática del extracto "Saccharomyces cerevisiae" de la levadura de panadería.

## INFORME DE ORIGINALIDAD

10%	10%	2%	5%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	1%
2	Submitted to ITESM: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Trabajo del estudiante	1%
3	repositorio.cinvestav.mx Fuente de Internet	1%
4	idoc.pub Fuente de Internet	1%
5	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
6	www.repositorio.usac.edu.gt Fuente de Internet	1%
7	docplayer.es Fuente de Internet	1%
8	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1%
9	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1%
10	ciatej.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	<1%

11	<a href="http://repositorio.utc.edu.ec">repositorio.utc.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1 %
12	<a href="http://www.revista.unam.mx">www.revista.unam.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
13	<a href="http://www.uco.es">www.uco.es</a> Fuente de Internet	<1 %
14	<a href="http://stutzartists.org">stutzartists.org</a> Fuente de Internet	<1 %
15	<a href="http://app.inti.gob.ar">app.inti.gob.ar</a> Fuente de Internet	<1 %
16	Submitted to Universidad del Pacifico Trabajo del estudiante	<1 %
17	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	<1 %
18	Submitted to Universidad Catolica San Antonio de Murcia Trabajo del estudiante	<1 %
19	<a href="http://www.scielo.br">www.scielo.br</a> Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 30 words

Excluir bibliografía

Activo