



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ENZIMAS COMERCIALES POR EXTRACCIÓN
(RENINA)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
MARIA LILIA MEDINA VEGA
QUERÉTARO, QRO. 1979

No. Reg. 58156

TS

Clas. 547.758

M 491 e

A mis Padres

ELIA

y

RUBEN

con gratitud y reconocimiento al
esfuerzo realizado, para darme -
lo que hoy he logrado.

A mis hermanos

BERTHA

YOLANDA

UBALDO

RUBEN

HECTOR ALEJANDRO

FABIOLA ROSSANA

con afecto.

A mi abuelito

LUIS

A mis tios

HEBERTO

LUIS

JOSEFINA

AURORA

EMMA

**por el apoyo recibido
durante mi carrera.**

A todos mis Maestros con admiración
y gratitud a su labor de enseñanza.

A mi Maestra y Directora de Tesis
MA. CONCEPCION GARCIA DE PEREZ
con agradecimiento por su ayuda y
orientación recibida en toda mi -
carrera y en la realización de es
te trabajo.

A mi querida Escuela
y Universidad.

Al Honorable Jurado:

MA. CONCEPCION GARCIA DE PEREZ

ALFONSO PEREZ BUENROSTRO

FELIPE OLMOS

CARLOS SIERRA

A mis compañeros y amigos.

·INDICE GENERAL

INDICE

	pág.
I. OBJETIVO	1
II. INTRODUCCION	2
III. RENINA. CONSIDERACIONES GENERALES	5
A. Naturaleza Química de las enzimas	5
B. Definiciones	6
C. Mecanismo sobre la coagulación de la leche.	7
1. Coagulación de la leche de vaca.	13
2. Cinética de la fase primaria de la acción de la renina.	14
3. Fase primaria de la acción de la renina sobre la leche.	16
D. Análisis.	18
1. Coagulación de la leche.	18
2. Proteasa.	19
3. Lipasa	20
IV. RENINA ANIMAL.	21
A. Renina de Ternero.	21
B. Secuencia completa de los aminoácidos de la proquimosina.	22
V. UTILIDAD COMERCIAL DE LAS ENZIMAS.	31
VI. MATERIAL Y METODOS.	34
A. Material	34
B. Reactivos.	35
C. Enzimas Comerciales por Extracción (Renina)	36
D. Purificación Parcial	48
VII. RESULTADOS.	50
VIII. CONCLUSIONES.	56
IX. BIBLIOGRAFIA.	57

I. O B J E T I V O.

OBJETIVO

El principal objetivo que se pretendió alcanzar con este trabajo, en el cual se trataron exclusivamente el -- 40. estómago de ternero (cuajo), que en este caso en particular fueron de chivos lactantes. Fué proporcionar un panorama general sobre uno de los métodos por los cuales se puede obtener el mayor rendimiento posible de esta enzima renina, ya que desde hace mucho tiempo en la industria lechera se ha usado con el fin de cuajar la leche.

Además se hace referencia a las pruebas bacteriológicas que se deben efectuar con el objeto de proporcionar un producto libre de microorganismos patógenos al hombre. Así como uno de los métodos de purificación para separar a las enzimas que se encuentran unidas a la renina.

II. I N T R O D U C C I O N .

INTRODUCCION

Uno de los alimentos nutritivos altamente estimados - por el hombre es el queso. El mérito nutritivo de este co mestible es atribuído a la concentración de proteínas y -- grasas de la leche así como de vitaminas, minerales y otros nutrientes. Aunque el queso en general se puede clasificar en 18 variedades básicas, hay tal vez mil diferentes quesos fácilmente distinguidos por paladares satisficados.

El queso probablemente derivó del proceso natural de - leche fermentada. Este proceso, se inició por la fermenta- ción de la lactosa a ácido láctico por microorganismos natu- rales. El pH bajo del ácido láctico es suficiente para la coagulación de la caseína. Al originarse el uso de extrac- tos vegetales, microbianos y animales se ha facilitado más la práctica y directamente la coagulación de la leche.

Las reninas microbianas, sobre las otras son relativa- mente recientes innovaciones. El primer registro de refe- rencias de potencial de renina microbiana son por Conn y Go- rini en 1892.

La enzima comercial más común, usada en todo el mundo se derivó del cuarto estómago de terneros lactantes. Se re- firió generalmente como extracto de renina. La cantidad de renina agregada a la leche para la coagulación puede variar

con el tipo de queso producido. Por ejemplo en los Estados Unidos de 2 a 4 onzas de renina son añadidas a 1000 libras de leche para producir alrededor de 100 libras de queso Cheddar mientras que 1/30 de una onza suele ser usado para quesón.

En 1970, sobre 2.2 billones de libras de queso fueron consumidos en Estados Unidos. Mientras que fuera es mayor el consumo.

La renina de ternero se toma como estándar en la industria para medir los otros coagulantes. Sin embargo tomando en consideración el hecho de que en el mundo es difícil conseguir en grandes cantidades estómagos de terneros por razones que se utilizan directamente como alimentos, ya que en los animales adultos se encuentra la renina en muy poca cantidad unida a la pepsina. El precio de la enzima en los Estados Unidos se ha incrementado alrededor del triple durante la pasada década.

El problema que se presenta en estas extracciones es de origen microbiano, es decir puede haber en el producto final la presencia de microorganismos patógenos para el hombre como son: Estreptococos, Estafilococos, Scherichia coli, etc.

Si agregamos a todo esto que numerosas personas en to-

do el mundo son opuestas a el uso de ciertas secreciones de los animales ya sea por su religión, dieta, etc. Todos estos factores han contribuido a buscar extractos de renina - microbiana o de origen vegetal.

III. R E N I N A.

CONSIDERACIONES GENERALES.

RENINA. CONSIDERACIONES GENERALES

A. NATURALEZA QUÍMICA DE LAS ENZIMAS.

Existen numerosas razones para afirmar que las enzimas son proteínas. Las más importantes son las siguientes:

a) El análisis de las enzimas obtenidas en forma más pura, cristalizada, demuestra que son proteínas.

b) Las enzimas son inactivadas a altas temperaturas y, en general, la cinética de la desnaturalización térmica de las enzimas da resultados muy parecidos a los de la desnaturalización térmica de las proteínas; por ejemplo, el Q_{10} de la mayoría de las reacciones químicas es de 2 a 3, y, en el caso de las enzimas, a temperaturas elevadas, alrededor de 50 a 70° C., la actividad neta aumenta varios cientos, como sucede con la velocidad de la desnaturalización térmica de las proteínas.

c) En su composición en términos de los elementos y -- sus proporciones en la molécula, enzimas y proteínas muestran proporciones semejantes de carbón, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, sulfuro y fósforo.

d) Las enzimas son activadas en una zona muy restringida de pH y presentan un punto óptimo de pH donde su actividad es mayor. En esto recuerdan a las proteínas que tienen un punto isoeléctrico determinado. Las proteínas, en su --

punto isoeléctrico, muestran propiedades parecidas desde el punto de vista de viscosidad, solubilidad, difusión, etc., que resultan del todo similares a las propiedades de este tipo que muestran las enzimas.

e) Todos los agentes que desnaturalizan a las proteínas también destruyen o inactivan a las enzimas, ya sea el calor, los ácidos fuertes, o los metales pesados que pueden combinarse con ellas.

f) Los problemas de solubilidad y de precipitación son comunes a las proteínas y las enzimas; en general, son solubles en agua o soluciones salinas, insolubles en alcohol, - precipitan con determinadas concentraciones de sales neutras, etc.

B. DEFINICIONES.

La renina (quimosina) es una enzima coagulante de la leche que se halla en el jugo gástrico. Es el constituyente activo, más importante del cuajo, un preparado del tejido glandular del cuarto estómago de los terneros lactantes, utilizado en la fabricación de queso y para algunas preparaciones de budines. Hubo una época en la cual la existencia de la renina como una enzima, distinta de la pepsina estuvo en discusión dado que ésta, lo mismo que otras proteínas, - también coagulan la leche. No obstante, se han logrado ais

lar tanto pepsina como renina, la última en forma cristalina. Se ha demostrado que la renina cristalina posee actividad proteolítica, siendo su pH de actividad óptima menos ácido que el de la pepsina sobre el mismo sustrato.

Es importante distinguir entre la enzima renina (rennin) y la renina (rennet) en polvo o extracto que son producidos de los estómagos de terneros, corderos o cabras jóvenes. Nótese que la renina (rennin) es una enzima derivada del riñón y es asociada con hipertensión. La renina es el agente proteolítico de la coagulación de la leche encontrada en la renina (rennet), pero otras enzimas pueden estar presentes en los extractos comerciales crudos.

La enzima renina contiene considerables cantidades de pepsina si los estómagos de terneros viejos o de vacas son incluidos con los estómagos de terneros lactantes. La pepsina bovina ha sido descrita como renina de bovino adulto.

C. MECANISMO SOBRE LA COAGULACION DE LA LECHE.

El queso es producido en todo el mundo de leches de una gran variedad de animales, por ejemplo: búfalos, camellos, cabras, llamas, ovejas, etc. Por supuesto, la proporción preponderante de queso producido sobre una escala comercial deriva de leche de vaca.

La coagulación de la leche por la renina ha sido investigada extensivamente, e hipótesis propuestas para explicar este fenómeno. El mecanismo de la reacción presenta uno de los más interesantes problemas de la química enzimática de los alimentos.

Los materiales nitrogenados en la leche de vaca son: 78 % de caseína, 5.1 % de α -lactoalbumina, 8.5 % de β -lactoglobulina, 1.7 % de peptona y 5 % de sustancias derivadas no proteicas.

En la práctica, la renina es agregada a la leche para causar la precipitación de la caseína y consecuente formación de la cuajada. La cuajada es tratada para producir un queso cuyo tipo está determinado por la naturaleza del procedimiento empleado.

Está demostrado que la renina actúa como una proteasa, que rompe las cadenas del péptido de la caseína produciendo la coagulación de la leche. La química de la caseína es -- muy compleja. Será considerada brevemente puesto que la renina parece actuar solamente en una fracción particular de la caseína. La caseína está presente en la leche fresca o en la espuma en micelios de 400 - 2800 Å de diámetro, que están en equilibrio con la caseína soluble. Si la leche es diluida o son adicionados fosfatos o iones oxalato, el equi

librio es cambiado hacia la caseína soluble; si los iones - calcio son añadidos, el equilibrio es cambiado hacia caseína miceliar.

La renina es creada para atacar la acción de la k-caseína liberando 1.8 grupos ácidos por peso molecular de - - 100,000. Un glicopéptido de peso molecular 8 000 fué también liberado, comprendiendo 72% de péptidos y 28% de carbohidratos.

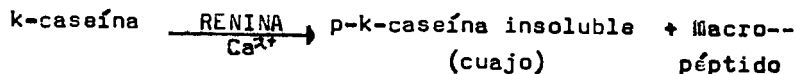
La enzima hidroliza la k-caseína en p-k-caseína, la -- cual precipita en la presencia de iones calcio. El transporte de calcio o la adición de citrato o fosfato tan practicado en la producción de leche evaporada disminuye la tendencia hacia la coagulación.

En general hay dos fases distintas durante la coagulación, las cuales pueden ser reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Las dos reacciones pueden actualmente separarse, si la renina actúa sobre soluciones de caseinato de sodio a una relatividad de valores altos de pH, o muy bajos niveles de calcio. También pueden separarse las dos reacciones llevando a cabo la hidrólisis enzimática a temperaturas muy bajas porque la reacción de precipitación secundaria ocurre solamente a temperaturas altas.

Aunque la leche no coagulará con la adición de la reni

na bajo ninguna de estas condiciones.

Esto indica que el proceso de coagulación de la caseína puede ser separado en dos pasos. En el primer paso, la caseína es convertida enzimáticamente en p-caseína por la acción de la renina (fase primaria) y en el segundo paso la p-caseína es coagulada no enzimáticamente por calentamiento en presencia de iones Ca^{2+} (fase secundaria).



La teoría común sostiene que la k-caseína actúa como un coloide protector, estabilizando el micelio de la caseína, cuya hidrólisis permite la precipitación de todas las fracciones de la caseína si los iones Ca^{2+} están presentes.

La k-caseína con un peso molecular menor de 30 000 es una fosfoproteína conteniendo aproximadamente 6-10% de carbohidratos (galactosa, galactosamina, ácido siálico). Estos no precipitan en la presencia de iones calcio. La acción de la renina resulta de la formación de una glicoproteína conteniendo de 20-30% de carbohidratos y p-k-caseína. La glicoproteína representa menos del 80% del componente soluble. La p-k-caseína precipita y deja precipitar a las otras fracciones de caseína.

La naturaleza de la unión entre la glicoproteína y la

p-k-caseína no ha sido determinada con certeza. Puede estar unido a un ester o un péptido, en otro caso esta unión es rota específicamente por la acción de la renina.

En la tabla se muestra el efecto de la reacción del amino libre, carboxilo libre, o grupos SH de la caseína con varios reactivos sobre la coagulación del substrato o en proteolisis por la renina.

La coagulación está indicada por un aumento en la densidad óptica de la solución de caseína; la proteolisis está expresada como la cantidad de tirosina formada. La desfosforilación de la caseína anula la coagulación pero no afecta la proteolisis. Hill encontró que la oxidación de los residuos metionilo de la k-caseína no tiene efecto en la acción de la renina pero que a la oxidación de los residuos histidilo o triptofanilo la renina-sensible rodea el enlace de la k-caseína para participar en la división por la renina. Se fraccionó la k-caseína en un precipitado y una fracción sobrenadante después de la reducción con borohidruro de litio. Encontraron la composición química del precipitado y del sobrenadante que es del todo semejante a la p-k-caseína y glicoproteína, respectivamente, y que ambos el precipitado y la p-k-caseína tienen el mismo aminoácido carboxilo terminal, fenilalanina.

TABLA. Efecto de la modificación de la caseína sobre la --

actividad de la coagulación y la actividad de la --
peptidasa de la renina.

SUBSTRATO	ACTIVIDAD DE COAGULACION (Aumento en den- sidad óptica).	ACTIVIDAD DE LA PEPTIDASA (Tirosina forma- da).
Caseína	0.33	34
N-acetil caseína	0	29
Hidroximetil caseína	0	19
Dinitrofenil caseína	0	5
Carbamil caseína	0.05	29
Acetil caseína	0.024	6
p-mercuro benzoato S-ca seína.	0.318	34
Defosforilado caseína	0	33
Reducida -caseína	0.335	--
Refosforilado defosfo-ca seína.	0.260	--

De estas observaciones se especularon que en valores -
neutros de pH la hidrólisis de la k-caseína sucede en el en
lace sensible específico de la k-caseína. Puesto que la re
nina pierde más su actividad en un pH neutro, está hidróli-
sis no puede ser atribuída a la acción específica de la re-
nina pero si de la estructura específica de la k-caseína.
Esta especulación es sostenida por la observación de que la

coagulación de la leche puede ser llevada a cabo no solamente por la renina, sino también por la pepsina, tripsina y quimotripsina, las dos últimas enzimas actúan por un mecanismo diferente de la renina.

1) COAGULACION DE LA LECHE DE VACA POR LA RENINA.

Existen variaciones entre las leches de las vacas que pueden ser debidas a factores tales como: concentración de iones Ca^{2+} ó pH de la leche, que afecta la fase de coagulación, o a la cantidad y composición de la k-caseína, que puede afectar la primera fase de la acción de la renina.

La fase primaria puede ser estudiada convenientemente por la siguiente liberación de glicopéptidos en forma de k-caseína como fué determinada por el aumento en el nitrógeno soluble en el 12% (m/v) de ácido tricloroacético filtrado de la leche después de la adición de la enzima. Usando las muestras de las leches de las vacas que estuvieron en período de lactancia y libres de infecciones bacterianas de la ubre, se observó que el tiempo de coagulación de la leche disminuyó con un aumento inicial del porcentaje de la fase primaria que es un factor crítico en diferentes determinaciones en el tiempo de coagulación. Además, se observó que el porcentaje inicial de liberación de glicopéptidos aumentó con la cantidad de glicopéptidos liberados por la renina.

Es posible que en las concentraciones usadas, la enzima puede estar presente en exceso; así que el porcentaje -- inicial de liberación son determinados por las concentraciones del substrato. Sin embargo esta explicación es impropia porque cuando la concentración de la renina es variada hay un cambio correspondiente en el porcentaje inicial de liberación de los glicopéptidos y en el tiempo de coagulación de la leche.

Ha sido postulado que la k-caseína micelar estabiliza los micelios de la caseína y que el suero o renina-accessible de la k-caseína es responsable de la coagulación de la leche. Cuando el suero de la k-caseína es hidrolizado, la p-k-caseína insoluble queda bien ligada a la superficie de varios micelios y así se une a ellos a la vez formando una cuajada.

La cantidad de suero de la k-caseína puede estar directamente relacionado con la eficiencia de la coagulación. -- Asumiendo que el total de glicopéptidos liberados por la acción de la renina puede ser usado como una medida de la cantidad de suero de la k-caseína en la leche, entonces el resultado está en completo acuerdo con las ideas presentadas.

2) CINÉTICA DE LA FASE PRIMARIA DE LA ACCIÓN DE LA RENINA SOBRE LA LECHE ENTERA.

La cinética de la fase primaria de la acción de la renina sobre la leche entera.

Una forma integrada de la Ecuación de Michaelis-Menten fué usada para calcular valores para K_m y V de los resultados obtenidos. Los valores de leches de diferentes vacas varió de 6.70×10^{-6} a 5.42×10^{-5} M para K_m y de 7.01×10^{-11} a 4.52×10^{-10} mol de glicopéptido $\cdot s^{-1} \cdot l^{-1} \cdot \mu g^{-1}$ de renina $\cdot l^{-1}$ de leche para V .

Hay una relación lineal entre la velocidad inicial de liberación de glicopéptidos y la concentración de la enzima, la cual varió entre leches. La constante de proporcionalidad fué usada como un cálculo aproximado de la actividad específica y los valores obtenidos fueron entre 0.60 y 1.15 mg de N. $\min^{-1} \cdot l^{-1} \cdot \mu g^{-1}$ de renina. ml^{-1} de leche.

Observando estos resultados se sugiere que hay un cambio en la afinidad de la enzima para el substrato de la k-caseína entre diferentes muestras de leches. Esto puede -- ser debido al medio ambiente iónico de la leche, la cantidad de k-caseína en la leche, que puede determinar el tamaño de los micelios de la caseína, o la composición de la k-caseína. Las variaciones en la composición de la k-caseína son debidas en gran parte a diferencias en los carbohidratos unidos a ellos.

Recientemente Sinkinson & Whedlock han mostrado que la cantidad de ácido N-acetil neuramínico / d-galactosa está en relación molar con el aumento de glicopéptidos que están siendo liberados por la acción de la renina. Este descubrimiento sugiere que los glicopéptidos con poca cantidad de ácido n-acetil neuramínico son liberados en un porcentaje más rápido que los que tienen mayor cantidad. Por lo tanto los parámetros de la cinética para la liberación de cada glicopéptido puede ser parcialmente determinado por los carbohidratos que están ligados a ellos. Para una muestra de leche, los valores de Km y V podría ser por lo tanto un valor promedio determinado por las proporciones relativas de diferentes k-caseínas presentes. Como las proporciones varían entre leches, entonces habría cambios correspondientes en Km y V. La actividad específica podría ser determinada por la composición de la k-caseína que es atacada inicialmente.

3) FASE PRIMARIA DE LA ACCION DE LA RENINA SOBRE LA LECHE ENTERA.

La coagulación de la leche por la enzima renina es considerado como un proceso de dos períodos. Durante la primera fase la k-caseína es hidrolizada por la enzima y entonces con la presencia de Ca^{2+} los micelios de la caseína son precipitados. Cuando la k-caseína se hidroliza los péptidos y los glicopéptidos son liberados. Estos glicopéptidos

contienen casi todos los azúcares ligados a la k-caseína y son solubles en 12% (m/v) de ácido tricloroacético. Se es pero por lo menos que los péptidos podrían estar presentes en el 12% de ácido tricloroacético filtrado de la leche en tera después de la acción de la renina. El aumento de nitrógeno en el 12% (m/v) de ácido tricloroacético filtrado ha sido usado como un método de estudio de la fase prima-ria de la acción de la renina en la leche entera. En una tentativa para comprobar este acercamiento se han investigado los carbohidratos que están unidos a estos glicopéptidos.

A la fecha, se han identificado el ácido n-acetil neu-ramínico, d-galactosa y 2 acetamida-2 deoxi-d-galactosa sobre los glicopéptidos. Estos azúcares son los mismos que los identificados en la k-caseína y por primera vez demos-traron que el 2-amino-2 deoxi-d-galactosa está presente co-mo el derivado n-acetil. Otros azúcares parecen estar pre-sentes en cantidades pequeñas, pero todavía no han sido i-dentificados.

Como los azúcares son liberados de la misma proporción como el nitrógeno, los resultados confirman que la fase primaria en la leche entera consiste por lo menos de la divi-sión de la k-caseína con la liberación de glicopéptidos so-lubles en 12% de ácido tricloroacético.

D. ANALISIS

1. COAGULACION DE LA LECHE.

No hay un estándar universalmente aceptado en los procedimientos de análisis para la determinación de la potencia de la renina en la coagulación de la leche. Existen diferentes métodos. Pero hay considerables variaciones entre las técnicas analizadas. Por ejemplo, la leche puede ser entera o desnatada, cruda o pasteurizada, reconstituída, se ca entera o leche en polvo no grasienta, etc. Si es usada la última, el método de secado de la leche constituye otra variación. Por supuesto los constituyentes de la leche pueden variar con el lugar, la estación ó ambos. Los análisis de la coagulación de la leche varían en el uso (o no uso) de buffers y cofactores (calcio), también en el pH, temperatura, mezcla de técnicas, determinaciones finales y concentración de ingredientes. En los análisis comparativos se encontró que la variación de algunos parámetros son bastante extensos. Por ejemplo, la variación de temperatura de -30 a 45° C. y pH desde 5.0 a 6.7.

En los análisis de renina animal, el porcentaje de coagulación de la leche el tiempo es inversamente proporcional a la concentración de la enzima. En los análisis de substitutos de renina animal, el tiempo de coagulación de la leche podrá caer dentro de la variación en el cual es propor-

cional a el recíproco de la concentración de la enzima. Es bastante difícil, comparar las potencias. En estos análisis la renina animal o renina generalmente es empleada como un estándar control.

2. PROTEASA.

La falta de un estándar también aplicados a el de las proteasas. La Unión Internacional de Bioquímica ha intentado definir una unidad estándar de la actividad de la enzima. Pero parámetros como pH, aditivos, substratos, etc. -- obviamente no pueden ser uniformemente específicos para todas las enzimas. Es conocido que muchas, si no la mayoría de las enzimas proteolíticas coagulan la leche. De hecho -- la coagulación de la leche puede ser usada como un análisis de la actividad proteolítica. La renina animal posee -- una de las más altas, si no la más alta, y es el estándar -- para substitutos potenciales.

Los substratos pueden ser caseína, la cadena B de la -- insulina, hemoglobina, péptidos sintéticos, etc. Así como los parámetros usuales: pH, temperatura, tiempo de reacción, etc., también varían. En el análisis cuantitativo -- típico, la enzima y el substrato reaccionan y el substrato no digerido es precipitado con ácido tricloroacético. El filtrado claro, o sobrenadante, es recobrado y la liberación de aminoácidos aromáticos midiendo la absorbancia a --

280 nm. El grado de absorbancia es un índice de la actividad de la enzima.

3. LIPASA.

Un componente contaminante el cual puede acompañar a la renina es la enzima lipasa. Esta enzima generalmente es tá presente en cantidades pequeñas. Sin embargo, los substitutos potenciales de renina serían probados, puesto que la actividad excesiva de la lipasa puede llevar un sabor in deseable (rancidez) en el desarrollo del queso. Por otra parte, ciertos niveles de actividad de la lipasa puede contribuir convenientemente al sabor o igual puede ayudar a acelerar la maduración del queso.

IV. R-E N I N A A N I M A L .

RENINA ANIMAL

A. RENINA DE TERNERO.

La renina está formada del precursor inactivo prorenina. Es convertida a renina a través de la hidrólisis parcial como lo indica la reducción del peso molecular de -- 36,000 a 31,000. El proceso de la activación de prorenina es afectado por el pH y por la concentración de sal. La -- conversión de prorenina a renina ocurre a un pH abajo de -- 5.0, es activada principalmente por autocatálisis, pero a -- pH 2, donde el proceso es muy rápido. Está haciéndose pa-- tente que la activación de proenzimas casi siempre significa que se separa de la molécula una fracción peptídica inhibidora o bloqueadora. En este caso no se ha observado que el péptido formado inhiba la actividad de la renina en la -- coagulación de la leche, como se observó con la activación de la pepsina.



La prorenina es estable a pH de 5.3 a 9.0. La renina en solución es más estable a pH de 5.3 a 6.3, y es exactamente estable a pH 2. En el pH intermedio de 3.5 a 4.5, -- pierde actividad por la misma digestión. La actividad de -- la leche coagulada desaparece rápidamente a pH neutro y alcalino.

No hay duda que la renina y la pepsina (especialmente la renina bovina) se parecen, pero solamente de un modo general; por ejemplo, ambas enzimas: a) provienen de los zimógenos, b) son proteasas del ácido gástrico, c) actúan semejante sobre la cadena del péptido de la k-caseína, d) tienen peso molecular aproximado, e) tienen semejante especificaciones proteolíticas sobre la cadena β de la insulina oxidada, y f) tienen alta proporción de actividad de coagulación de la leche, aunque la renina es claramente más alta.

Schwander et al. determinó la composición de aminoácidos de renina cristalina, ellos llevaron a cabo un número de investigaciones electroforéticas sobre papel filtro, concluyendo que el punto isoeléctrico se coloca alrededor de pH 4.5. El peso molecular fué encontrado ser de 30 000 a 40 000, el coeficiente de dilución el cual dependió de la concentración siendo 9.5×10^{67} sc, cm./sec sobre extrapolación a dilución infinita.

La composición de aminoácidos es como sigue: ala₁₃, - arg₅, asp₃₀, 1/2 cys₆, glu₂₉, ileu₁₅, leu₁₉, lys₈, met₇, - phe₁₄, pro₁₂, ser₂₇, thr₁₈, try₁₅ y val₂₁.

B. SECUENCIA COMPLETA DE LOS AMINOACIDOS DE LA PROQUINOLISINA

SUMARIO.

La secuencia total de 365 residuos de aminoácidos es -

presentada. El alineamiento con la secuencia de los aminoácidos de pepsinógeno porcino muestra que 204 residuos de aminoácidos son común para los dos zimógenos. Además la comparación y alineamiento con la secuencia de aminoácidos de penicilopepsina muestra que 66 residuos son localizados en posiciones iguales en las tres proteasas. Las tres enzimas corresponden a un grupo de proteasas con dos residuos de aspartato en el centro activo. Este grupo forma una familia derivada de un antepasado común.

QUIMOSINA. Es la mayor enzima proteolítica en el estómago de ternero. Como la pepsina, la quimosina corresponde a un grupo de proteasas ácidas en las cuales los dos residuos de aspartato participan en el mecanismo catalítico.

La quimosina se secretó como un precursor inactivo la proquimosina, constando de una sola cadena peptídica con 365 residuos de aminoácidos. El zimógeno es irreversiblemente convertido en enzima activa por proteólisis limitada durante el cual un total de 42 residuos de aminoácidos son liberados de la parte amino terminal de la cadena peptídica.

La proquimosina contiene seis mitades de residuos de cisteína formando tres puentes disulfuro. Investigaciones sobre la estructura primaria empezó con la determinación de la secuencia de aminoácidos alrededor de los puentes disulfuro.

Esta comunicación presenta la secuencia completa de aminoácidos de proquimosina B. Se mostró que este zimógeno es altamente homólogo al pepsinógeno porcino A.

METODO.

La proquimosina y la quimosina usadas en estas investigaciones fueron preparadas en el laboratorio.

La secuencia fué obtenida después de una serie de experimentos llevados a cabo en paralelo. En la mayoría de los casos los primeros pasos fueron desunión enzimática con -- tripsina o desunión química con bromuro de cianógeno. Para mejorar la solubilidad de la recopilación y para reducir el número de fragmentos, se usaron preparaciones de maleylated ó citraconylated para las digestiones con tripsina. Las digestiones fueron llevadas a cabo a 12^o (pH 8, por 15-30 minutos). Después de este tratamiento son purificados por -- filtración con gel sobre Sephadex G-100 en 0.05 M NH₄HCO₃, a pH 8, con 8 M de urea. Después la desunión de quimosina con bromuro de cianógeno los fragmentos son purificados por filtración con gel sobre Sephadex G-100 en 25% de ácido acético. El mejor resultado fué obtenido si la desunión es -- llevada a cabo sobre enzimas con puentes disulfuro intactos.

RESULTADOS.

La FIG. I muestra en forma esquemática la localización relativa de los fragmentos obtenidos después de la des unión con bromuro de cianógeno o digestión triptica. La se cuencia final de la proquimosina es presentada en la FIG. 2

La mayoría de la estructura de los residuos de aminoácidos han sido identificados en dos o más péptidos independientes. Algunas excepciones son los residuos desde el no. 230 al no. 250. Debido al carácter apolar de esta región - los péptidos han sido difícil de aislar.

Si se suman los pesos moleculares de todos los resi- duos en proquimosina y quimosina, son encontrados los pesos moleculares de 40,777 y 35,652. Estos son más altos que -- los pesos moleculares publicados anteriormente; pero si las composiciones originales de los aminoácidos son recalculadas sobre las bases de los pesos moleculares encontrados -- por determinación de la secuencia, hay un acuerdo satisfactorio. (TABLA I).

DISCUSION.

La quimosina cristalina es dividida en tres componen-- tes diferentes por cromatografía en columna DEAE -celulosa. De estos, el componente designado quimosina C es en parte - enzima autolizada, mientras que existen diferentes zimóge-- nos para cuimosinas A y B. La proquimosina B es la más - -

abundante de las dos, y todos los residuos han sido identificados en esta proteína. Los fragmentos obtenidos por digestión triptica y por desunión por bromuro de cianógeno de quimosina A separados por filtración en gel es una forma in distinguible para los fragmentos de quimosina B. Además, los fragmentos individuales de quimosina A y B tienen compo sición muy semejante de aminoácidos. Un total de 119 residuos han sido identificados en la quimosina A, y entre estos se han encontrado solamente uno que es diferente de los residuos correspondientes en quimosina B; en posición no. 290 la quimosina A tiene ácido aspártico, mientras que la quimosina B tiene glicina. Allí pueden estar más diferencias, pero se puede concluir que las dos estructuras son muy semejantes.

Sin embargo la diferencia más importante destaca de la comparación de la estructura primaria con las estructuras primarias de las diferentes enzimas relacionadas. En la Fig. 2 se indican residuos que son común para la proquimosi na B bovina, pepsinógeno porcino A, y penicilopepsina. De las 373 posiciones para los residuos de aminoácidos en los dos zimógenos gástricos, 204 son ocupados por residuos comu nes. En quimosina B, 24 de 28 son glicinas, 12 de 15 son prolinas, y los tres puentes disulfuro son localizados en las mismas posiciones que en la pepsina A.

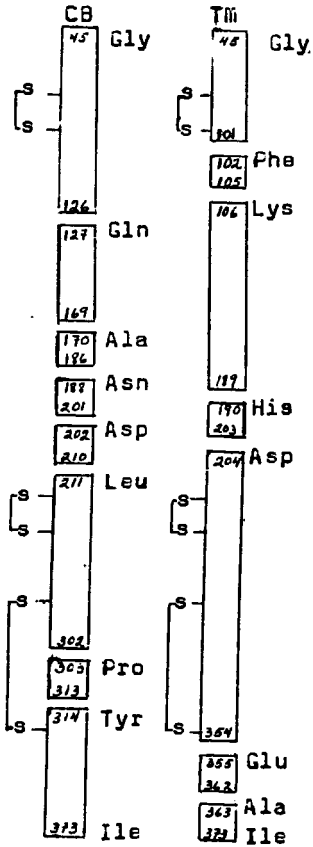


FIG. 1. Presentación diagramática de los fragmentos de quimosa obtenida por descomposición con Bromuro de cianógeno --(CB) y por digestión triptica de quimosina con grupos amino modificados (Tm). El residuo no. 187 es metionina. Fué recuperado como homoserina después de la descomposición con --(CB) pero no es formado como un fragmento separado. El NH₂-terminal de los fragmentos son mostrados. Todos los fragmentos CB excepto CB (314-373) tienen homoserina COOH-terminal; Todos los fragmentos Tm excepto Tm (363-373) tienen arginina COOH-terminal.

TABLA I. Composiciones de aminoácidos de proquimosina B y -
quimosina B .

	<u>Proquimosina B*</u>		<u>Quimosina B†</u>	
	AAA	Sec.	AAA	Sec.
Asx	37.6	37	34.8	36
Thr	23.0	24	21.4	23
Ser	34.4	35	31.0	31
Glx	40.9	39	33.6	33
Pro	15.7	16	14.0	15
Gly	32.1	32	28.4	28
Ala	16.9	17	14.9	15
1/2Cys	5.7	6	5.7	6
Val	25.7	26	24.3	26
Met	7.6	8	7.7	8
Ile	21.4	22	17.6	19
Leu	28.8	29	21.5	23
Tyr	20.7	22	17.9	19
Phe	18.6	19	16.0	17
His	5.6	6	4.8	5
Lys	14.6	15	9.4	9
Arg	7.9	8	5.6	6
Trp	4.6	4	4.8	4
Amide	38.3	39	35.6	36

* Comparación entre análisis de aminoácidos (AAA) y composiciones determinadas de las secuencias (SEC.)

† Peso Molecular: 40,777.

‡ Peso Molecular: 35,652.

	5	10	15	20
Ala·Glu·Ile·Tiro·Arg·Ile·Pro·Leu·Tyr·Lys·Gly·Lys·Ser·Leu·Arg·Lys·Ala·Leu·Lys·Glu·				
	25	30	35	40
His·Gly·Leu·Leu·Glu·Asp·Phe·Leu·Gln·Lys·Gln·Gln·Tyr·Gly·Ile·Ser·Ser·Lys·Tyr·Ser·				
	45	50	55	60
Gly·Phe·Gly·Glu·Val·Ala·Ser·Val·Pro·Leu·Thr·Asn·Tyr·Leu·Asp·Ser·Gln·Tyr·				
	65	70	75	80
Phe·Gly·Lys·Ile·Tyr·Leu·Gly·Thr·Pro·Pro·Glu·Glu·Phe·Thr·Val·Leu·Phe·Asp·Thr·Gly·				
	85	90	95	100
Ser·Ser·Asp·Phe·Trp·Val·Pro·Ser·Ile·Tyr·Cys·Lys·Ser·Asn·Ala·Cys·Lys·Asn·His·Gln·				
	105	110	115	120
Arg·Phe·Asp·Pro·Arg·Lys·Ser·Ser·Thr·Phe·Gln·Asn·Leu·Gly·Lys·Pro·Leu·Ser·Ile·His·				
	125	130	135	140
Tyr·Gly·Thr·Gly·Ser·Met·Gln·Gly·Ile·Leu·Gly·Tyr·Asp·Thr·Val·Thr·Val·Ser·Asn·Ile·				
	145	150	155	160
Val·Aso·Ile·Gln·Gln·Thr·Val·Gly·Leu·Ser·Thr·Gln·Glu·Pro·Gly·Asp·Val·Phe·Thr·Thr·				
	165	170	175	180
Ala·Glu·Phe·Asp·Gly·Ile·Leu·Gly·Met·Ala·Tyr·Pro·Ser·Leu·Ala·Ser·Glu·Tyr·Ser·Ile·				
	185	190	195	200
Pro·Val·Phe·Asp·Asn·Met·Met·Asn·Arg·His·Leu·Val·Ala·Gln·Asp·Leu·Phe·Ser·Val·Tyr·				
	205	210	215	220
Met·Asp·Arg·Asp·Gly·Gln·Glu·Ser·Met·Leu·Thr·Leu·Gly·Ala·Ile·Asp·Pro·Ser·Tyr·				
	225	230	235	240
Tyr·Thr·Gly·Ser·Leu·His·Trp·Val·Pro·Val·Thr·Val·Gln·Gln·Tyr·Trp·Gln·Phe·Tyr·Val·				
	245	250	255	260
Asp·Ser·Val·Thr·Ile·Ser·Gly·Val·Val·Val·Ala·Cys·Glu·Gly·Gly·Cys·Gln·Ala·Ile·Leu·				
	265	270	275	280
Asp·Thr·Gly·Thr·Ser·Lys·Leu·Val·Gly·Pro·Ser·Ser·Asp·Ile·Leu·Asn·Ile·Gln·Gln·				
	285	290	295	300
Ala·Ile·Gly·Ala·Thr·Gln·Asn·Gln·Tyr· ^{Asp} Gly·Glu·Phe·Asp·Ile·Asp·Cys·Asp·Asn·Leu·Ser·				
	305	310	315	310
Tyr·Met·Pro·Thr·Val·Val·Phe·Glu·Ile·Asn·Gly·Lys·Met·Tyr·Pro·Leu·Thr·Pro·Ser·Ala·				
	325	330	335	340
Tyr·Thr·Ser·Glu·Asp·Gln·Gly·Phe·Cys·Thr·Ser·Gly·Phe·Gln·Ser·Glu·Asn·				
	345	350	355	360
His·Ser·Gln·Lys·Trp·Ile·Leu·Gly·Asp·Val·Phe·Ile·Arg·Glu·Tyr·Tyr·Ser·Val·Phe·				
	365	370		
Asp·Ala·Ala·Leu·Val·Leu·Val·Gly·Ile·Ala·Lys·Met·Ile·				

FIG. 2

FIG. 2. La secuencia aminoácida de la proquimosina. - Para facilitar la comparación con el pepsinógeno porcino A, los pasos son marcados y enumerados. El NH_2 terminal de -- una quimosina activa es gly_{46} . Los puentes disulfuro unen Cys_{91} y Cys_{96} , Cys_{252} y Cys_{256} y Cys_{329} . Los residuos en una determinada fase es común para las enzimas gástricas y el penicilopepsina.

V. UTILIDAD COMERCIAL DE LAS ENZIMAS.

UTILIDAD COMERCIAL DE LAS ENZIMAS

Ya ha sido hecha la referencia para el control de los cambios indeseables en los alimentos producidos por la actividad de la enzima. Sin embargo, en procesos tales como el cocimiento, fabricación de dulces y tenderización de la carne, las enzimas pueden ser una ventaja como parte de la operación. Las enzimas industriales son por lo general obtenidas como concentrados parcialmente purificados de plantas, tejidos animales y de microorganismos. De todas las enzimas que se encuentran en las células, solo pocas comparativamente son producidas sobre una escala comercial para usar en los alimentos, piel, textiles, e industrias farmacéuticas.

A) FUENTES DE ENZIMAS INDUSTRIALES.

Los microorganismos son la mejor fuente de producción de las enzimas industriales. Debido a su rápido crecimiento, el potencial para la producción de la enzima es virtualmente ilimitada. Una gran cantidad de tejidos de plantas se necesitan para obtener un rendimiento razonable de la enzima, mientras que la producción de las enzimas de fuente animal es limitada por la escasez del material de carnicería.

1. Extracción.

Los tejidos de plantas y animales son homogenizados en agua o buffer. Los desechos insolubles son eliminados por centrifugación o filtración, dejando el extracto crudo acuoso. Las células microbianas son recolectadas del medio de cultivo.

2. Análisis de las Enzimas.

Para el análisis de las enzimas el problema es la separación de la enzima que se desea de una mezcla de cientos de proteínas química y físicamente semejantes.

Las moléculas pequeñas pueden ser eliminadas por diálisis y por adsorción. Los métodos más útiles incluyen precipitación con sales a diversas concentraciones ó solventes, calentamiento o desnaturalización, por pH, centrifugación, filtración por geles, electroforesis. Recientemente la cromatografía en columna ha sido usada con gran éxito.

Por último tenemos la cristalización que es el método mediante el cual se tiene la enzima en forma más pura; generalmente se hace con sulfato de amonio en solución. El estado cristalino no implica homogeneidad. Pruebas exhaustivas físicas, químicas y biológicas deben todavía ser aplicadas como criterio de pureza.

3. Aditivos.

Las enzimas son vendidas como concentrados líquidos ó sólidos, y son diluídas a una actividad estándar por sustancias tales como almidón o sacarosa. El estabilizador - por ejemplo, son sales de buffer, cloruro de sodio, benzoato de sodio, propionato de sodio, etc., son a menudo agregados al concentrado de la enzima para prevenir el crecimiento microbiano y la pérdida de la actividad de la enzima durante el almacenaje.

VI. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

Cubetas de plástico
Estufa con aire y temperatura
Molino de Carnes
Potenciómetro
Refrigerador
Agitador
Pipetas
Centrífuga
Tubos de centrífuga
Probetas
Frascos para probar actividad
Tubos
Pipetas Serológicas
Cajas de Petri
Tubos Khan
Matraces Erlenmeyer
Aza de platino
Frascos de dilución
Mechero, soporte, aro y tela
Balanza
Baño María
Portaobjetos
Microscopio
Estufa
Termómetro
Cuba Anaeróbica
Autoclave
Papel destrosa
Bomba de Vacío
Mangueras

REACTIVOS

Agua destilada y esterilizada
Cloruro de sodio al 10% y saturado
Acido clorhídrico 18%
Bicarbonato de sodio
Propionato de sodio
Benzoato de sodio
Tierra de Diatomeas
Sabor Caraway
Color Caramelo
Propilen glicol
Medio Agar Nutritivo
Agar 110
Infusión cerebro de corazón
Tinción de Gram: Violeta de Genciana
Safranina
Iodo Lugol
Base para gelosa sangre
EMB agar
Brillant Green Bile
Aceite de Inmersión
Estómagos de Terneros
Nitrógeno Líquido
Hielo
Sal
Leche
Acido Acético Glacial
Acetato de sodio anhidro
Acetona
Alcohol

ENZIMAS COMERCIALES POR EXTRACCION
(RENINA)

Existe marcada diferencia entre la manera de hacer - -
quesos en la antigüedad a la forma con que se hacen actual-
mente. Ahora se utiliza un extracto de un ml. de renina co-
mercial por cada 1000 libras de leche para hacer un queso -
de cualquier calidad. Mientras que la renina de la anti- -
güedad se reducía a una pieza de estómago de animal lactan-
te, ahora la renina es mejor definida como un extracto alta-
mente purificado de estómago de ternero, y contiene una en-
zima la renina que es un agente coagulante de la leche.

El extracto de renina es una de las mejores preparacio-
nes enzimáticas hechas sobre una escala comercial y que es
indispensable en la industria de fabricación de quesos.
En este reporte se tratará de la preparación de la renina -
por uno de los muchos productores de enzimas comerciales en
los Estados Unidos - Los Laboratorios Paul Lewis, Inc., de
Milwaukee, Wis.

La Industrialización de la Enzima Comercial.

La fabricación de enzimas vienen a llenar un hueco en-
tre toda la gran industria química procesadora. Esto es --
comparativamente pequeño en la industria especializada invo-
lucrada en la fabricación de enzimas para una gran variedad

de usos comerciales, el desarrollo y nuevas aplicaciones de las enzimas existentes y el encuentro de nuevos sistemas enzimáticos que pudieran ser aplicados en una gran escala.

En general cada ser vivo es una fábrica de enzimas. - La definición clásica de las enzimas es aquella que las define como catalizadores específicos los cuales llevan a cabo reacciones bioquímicas que hacen posible el proceso de la célula viva. En un sentido, las enzimas son moléculas - afines a la vida o sea, ellas son destruídas o inhibidas - por los mismos agentes que destruyen la vida como son: calor, ácidos y bases. Los catalizadores naturales son altamente específicos en su acción y muy diferentes enzimas se requieren frecuentemente para completar una serie de reacciones que tienen lugar dentro de la célula viva.

El interés comercial en las enzimas es debido a su -- utilidad en muchas áreas incluyendo el procesado de alimentos, la industria textil, industria de pieles, fermentaciones, y productos farmacéuticos. Algunas enzimas son utilizadas en artes fotográficas y como reactivos estándares. La producción total de enzimas o cifras vendidas no están disponibles, pero la industria textil ha reportado grandes cantidades. Tanto como 1,500 000 libras al año de enzimas que fueron usadas para la industria textil.

Procedimiento para la Fabricación de Enzimas.

Las fuentes más importantes en la industria enzimática provienen de bacterias, hongos, plantas y animales. Desde el punto de vista de Ingeniería las enzimas se obtienen por dos diferentes caminos básicos: la extracción, (el objeto de este reporte), y fermentación (para la extracción de enzimas microbianas).

Las enzimas comerciales son purificados de mezclas de enzimas que se encuentran con otros materiales provenientes de una preparación industrial sin contaminantes químicos.

La extracción es el método más antiguo de la preparación de enzimas comerciales y es utilizado para la producción de enzimas de fuentes animales y vegetales.

Laboratorios Paul -Lewis.

La firma Wisconsin fué incorporada en 1937 y, desde entonces, se ha concentrado en las técnicas de producción de enzimas y la enzimología. Los productos Paul Lewis se dividen en dos grandes grupos; industrias lecheras y cervecera. El mayor producto lacteo es el extracto de renina. --Otros incluyen colorantes, catalasa, e inicio de cultivos. Para las industrias cerveceras Paul Lewis prepara enzimas proteolíticas y diastáticas para muchos usos provenientes -

de talleres de prueba.

La renina es una enzima industrial típica en la preparación por extracción. El equipo es usado para la extracción de muchas otras enzimas como: papaína y ficina.

La Renina y Extracto de Renina.

La renina es una enzima que es inactivada por el calor, luz ultravioleta, formaldehído, cloroformo, dicromato y - - otras sustancias. El componente principal que coagula la leche es una enzima secretada por el 4o. estómago de ternero lactante. Su precursor inactivo es la prorenina, la -- cual es activada a renina por iones hidrógeno.

Los cristales de renina pura han sido preparados, pero sus propiedades químicas y físicas no han sido bien estudiadas. Todo lo que se sabe hasta aquí es que el material puro tiene una baja solubilidad y que la forma cristalina y - la actividad enzimática son conservadas durante el secado. La zona isoelectrica, el intervalo de pH en el cual una en zima exhibe su menor grado de solubilidad es pH 4.45 a 4.65. La enzima es inactivada cuando es expuesta a una temperatura de 50° C y pH 6.9 ± 0.1 durante 14 minutos.

Los trabajos más recientes de renina cristalina muestran que un mínimo de 4 componentes pueden ser separados e--

VII. RESULTADOS.

electroforéticamente. Esto plantea la posibilidad de que más de uno de estos componentes tienen una actividad de coagulación de la leche. Además el fraccionamiento llevaría un considerable aumento en la actividad específica.

La cantidad exacta de renina o más precisamente, la renina (rennet) que ha sido usada en la fabricación de queso es un problema de discusión. Muy probablemente fue usado ampliamente durante los días prebiblicos. Las enzimas con la actividad de coagulación fueron observadas cuando la leche fue almacenada en bolsas de piel de cabra (actualmente en los estómagos de cabra). Ampliamente usados en aquella era. La leche así guardada coaguló después de un corto tiempo llevándolo así a la observación en la cual el tejido del animal puede coagular la leche.

Así se encontró que el queso en el pasado se empezó a fabricar por la inmersión de los estómagos de los animales en la leche. Para conservar su abastecimiento de la leche, estos primeros fabricantes de queso empaparon los estómagos en suero (es la porción líquida remanente después de que la leche es coagulada), entonces se vertió la mezcla en la leche de los próximos días.

La producción comercial del extracto de renina comenzó en Europa hace tiempo en el siglo XIX, y en los Estados Unidos hace unos 75 años. Paul Lewis empezó la fabrica-

ción del material en 1950.

Frecuentemente, cerca de 300,000 galones del 100% de extracto de renina comercialmente estandarizado es usado en los Estados Unidos. El uso mundial es calculado como el equivalente a 1,000 000 galones del extracto de renina comercial americana. Cerca de 1 ml. de renina es usada para fabricar queso Cottagge, de 1000 libras de leche. Los diferentes quesos necesitan variadas cantidades; por ejemplo, Cheddar usa de 3 a 3.5 onzas. Paul Lewis y otros productores fabrican cerca del 90 a 95% de toda la renina producida hoy para el consumo de los Estados Unidos.

Preparación de la Materia Prima.

Los estómagos de terneros en el rastro son empacados con grandes cantidades de sal en barriles de acero con un recubrimiento de polietileno o en barriles de madera. Si no son procesados inmediatamente, los estómagos son dejados en estos recipientes y almacenados acerca de -30° F. A esta baja temperatura Paul Lewis no encontró una pérdida aparente de la actividad enzimática aún después de varios años de almacenamiento.

En la preparación del tejido para la extracción, los estómagos son primero lavados con una solución de cloruro de sodio saturado, una solución menos concentrada extraerfa

prorenina para remover la sal sólida. Los estómagos son entonces extendidos y se separa de ellos el exceso de grasa. Los estómagos lavados y desengrasados son colgados en ganchos y secados en un horno con circulación de aire a 110° F por 20 horas.

El control de calidad empieza en la etapa de secado. Sacando de un barril de aproximadamente 700 estómagos, 10 de ellos son escogidos al azar (hasta 20 de un nuevo proveedor), y extraído con agua de sal. Para ser aceptable, el extracto de renina cruda debe ser revisado en algún porcentaje arbitrario de un estándar purificado. El embarque es entonces clasificado sobre las bases de la actividad del extracto.

Debido a que los estómagos individuales varían ampliamente en el contenido de la enzima (los niveles de renina dependen de la dieta del ternero), este tipo de revisión puede parecer más bien imperfecta. Pero las comparaciones estadísticas de estas evaluaciones preliminares con la producción actual producen una correlación estrecha. Este extracto de la muestra es descartado después del ensayo y la serie principal de los estómagos es entonces enviada a la etapa de extracción.

La Extracción es el Corazón del Proceso.

Antes de la extracción, los estómagos son molidos en un molino de martillo con cualquier pedacería de madera o lana de vidrio. La proporción es aproximadamente acerca de 3 a 1. Hay varias razones para usar la lana de vidrio ó pedacería de madera. Primero, los materiales sirven como soportes inertes, con el fin de ayudar a filtrar. Otros tipos de soportes absorberían algún material activo del tejido, mientras que la lana de vidrio o pedacería de madera -- absorben muy poco. Otra razón para usar un soporte es la mucina (es una glicoproteína). Si los estómagos fueran extraídos sin un soporte inerte las características viscosas de las mucinas podrían permanecer en el fluido extraído. Por otra parte, la mucina hace la masa de la extracción tan espesa que no puede ser agitada o centrifugada.

La mezcla molida en el molino de martillo es transportada a tanques para extracción de madera. Paul Lewis usó una serie de tanques semejantes. Cada tanque tiene una capacidad de 2000 galones y guardan el equivalente de 10,000 a 15,000 estómagos. Cerca de 10 pulgadas, del fondo del tanque está una rejilla de madera cubierta con pedacería de madera no molida, la cual sirve como una cama. El tejido pulverizado en lana de vidrio o pedacería de madera es mezclado y puesto dentro del tanque.

Una solución de extracto de renina obtenida de las operaciones previas al lavado de renina es usada para cubrir -

el contenido de los tanques. Esta cubierta del lavado tiene una concentración de sal de aproximadamente 10% y un pH de 5.95 a 6.05. La extracción a contracorriente es empezada y continuada por dos días si la concentración de sal está en su óptimo (10%). La extracción toma más tiempo si la concentración de cloruro de sodio es mayor del 10%.

Un sistema de expansión de Freon lleva a la mezcla de la extracción de 35° a 40° F. Una porción del líquido circulante va sobre la bovina del refrigerador, la temperatura la cual es controlada termostáticamente. Una bomba de circulación mueve el líquido de la extracción, el cual es analizado diariamente para la actividad de la coagulación de la leche.

Cuando la actividad deja de incrementarse el fluido es sacado a tanques de acabado también hechos de madera. Aquí la prorenina en el extracto es activada a renina con solución de HCl al 18%. El ácido es agregado con agitación hasta que el pH del extracto alcance 4.6; alrededor de dos horas. La activación requiere de 14 a 36 horas, dependiendo de cuanto tiempo tome la prorenina para ser convertida a renina.

Cuando no hay un nuevo aumento de actividad, el exceso ácido es neutralizado por adición de una cantidad estequio-

métrica de bicarbonato de sodio como una agua viscosa. Este tratamiento eleva el pH a aproximadamente 5.7. Durante la neutralización la agitación es continuada con una varilla para eliminar el dióxido de carbono formado y ayuda a reemplazarlo con aire. Después, el propilen glicol es añadido a una concentración de alrededor de 5%. El glicol actúa como estabilizador de la proteína (o solubilizador) y mantiene bajo el crecimiento bacteriano. Son agregados el sabor caraway y el color caramelo, así como el propionato de sodio (2%) y benzoato de sodio (0.1%). La tierra de diatomeas son también agregadas en esta etapa para ayudar en la operación de filtración.

El contenido de los tanques pasan por dos filtraciones. Primero, el material es bombeado a una bolsa de filtración construída según las especificaciones de Paul Lewis. Las bolsas de filtración son sostenidas en una posición vertical. Estas bolsas están hechas de cañamo y son forradas en el interior con muselina.

Aproximadamente se llena al principio una 3a. parte de la bolsa con extracto. El líquido inicial el cual se filtra completamente de las bolsas es bombeado y regresa a través del filtro. Cuando el filtrado es claro y pasa de un lado a otro, es bombeado del fondo de los aparatos de filtración a un tanque de almacenaje refrigerado. Cuando la -

'filtración empieza a bajar lentamente, nuevamente son llenadas la 3a. parte de las bolsas.

El líquido obtenido de esta primera filtración es analizado. El paso de control de calidad incluye la actividad enzimática, pH, concentración de sal, color y claridad. Si el extracto pasa todas las pruebas es aprobado temporalmente.

Comienza la segunda filtración. Otra unidad de filtración semejante a la usada anteriormente excepto que tiene los filtros de las bolsas más pecueños. El extracto de la segunda filtración pasa las mismas pruebas de control de calidad. Después son enviados al departamento de bacteriología.

La prueba bacteriológica lleva 96 horas y es designada para determinar si hay o no bacterias formadoras de gas, --ninguno de estos microorganismos son permitidos por los patrones de Paul Lewis. Nunca hay hongos ni levaduras. Todo material rechazado es reprocesado. Y si el producto es aprobado está listo para empaquetarse.

El extracto de renina es empaquetado en bolsas de polietileno, en cartón o cajas de madera. Los tambores de acero fueron usados hasta hace poco. Estos llegaron a ser

anticuados por los problemas de corrosión que se encontraron debido a la concentración elevada de sal en el extracto.

El nuevo paquete de polietileno tiene varias ventajas definitivas sobre los otros recipientes. Es fácil para embarcar, peso ligero, conveniente para almacenar y sencilla para manejar. Los paquetes vienen en dos tamaños; 1 y 5 galones. Las bolsas de plástico son llenadas, selladas al calor, y las cajas de cartón cerradas. Una conveniencia más es que los recipientes vacíos son descartados por el consumidor. Paul Lewis también fabrica enzimas en polvo, principalmente para mercados extranjeros. El polvo es fabricado principalmente por una técnica de precipitación de sal. Una porción de la producción de la renina en polvo es dirigida a la fabricación de queso casero; es raro en los Estados Unidos pero muy común en Europa y otras partes del mundo. El polvo es envasado en recipientes de 25 gramos para este propósito.

PURIFICACION PARCIAL

Casi todos los tejidos contienen cientos de proteínas con actividad enzimática. La purificación de la enzima implica el aislamiento de una proteína específica a partir -- del extracto crudo de células totales el cual contiene mu-- chos otros compuestos de la proteína.

Los pasos que se siguen para esta purificación son los siguientes:

a) El extracto crudo de la enzima concentrada es cen-- trifugado a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4° C. y se dese-- chan los sólidos residuales.

b) El sobrenadante claro de la enzima se precipita - - agregando solventes orgánicos como etanol ó acetona a 4° C. (volumen de acetona o alcohol y enzima sobrenadante 3:1), - centrifugar a 10,000 rpm durante 15 minutos a 5° C y decan-- tar.

c) El precipitado de la enzima sólido con acetona se - disuelve en buffer de acetato ó fosfato a pH 5.6 y dializar con el mismo buffer de 16 a 18 horas a 4° C.

Solución A = 11.55 ml. de ácido acético glacial a un - litro.

Solución B = 16.31 gr de acetato de sodio anhidro ó -

27.22 gr de acetato de sodio $3H_2O$ de --
cristalización en un litro de agua destil
lada.

Se mezclan 4.8 ml. de solución A y 45.2 ml. de solu--
ción B en 100 ml.

d) La solución de la enzima dializada es centrifugada
a 5000 rpm durante 10 minutos a $4^{\circ} C$ y desechar sólidos re
siduales.

e) La solución clara acuosa de la enzima se liofiliza.
(nitrógeno líquido, hielo y sal).

PRUEBAS BACTERIOLÓGICAS

1. METODO PARA ANAEROBIOS.

Medio de Cultivo: Infusión Cerebro de Corazón

Resultado: Anaerobios Negativos

2. METODO PARA SCHERICHIA COLI.

Medio de Enriquecimiento: Brillant Green Bile

Medio Selectivo: EMB agar

Resultado: E. coli Negativa

3. METODO PARA ESTAFILOCOCO.

Medio de Enriquecimiento: Infusión Cerebro de Corazón.

Medio Selectivo: Medio No. 110

Resultado: Estafilococo positivo.
Coagulasa negativa.

4. METODO PARA ESTREPTOCOCO.

Medio de Enriquecimiento: Soya tripticasa ó Infusión Cerebro de Corazón.

Medio Selectivo: Gelosa Sangre.

OBSERVAR: Grado de Hemólisis.

- Hemólisis Parcial
- Hemólisis Total
- No hay hemólisis

Si es positiva se hace la Tinción de Gram.

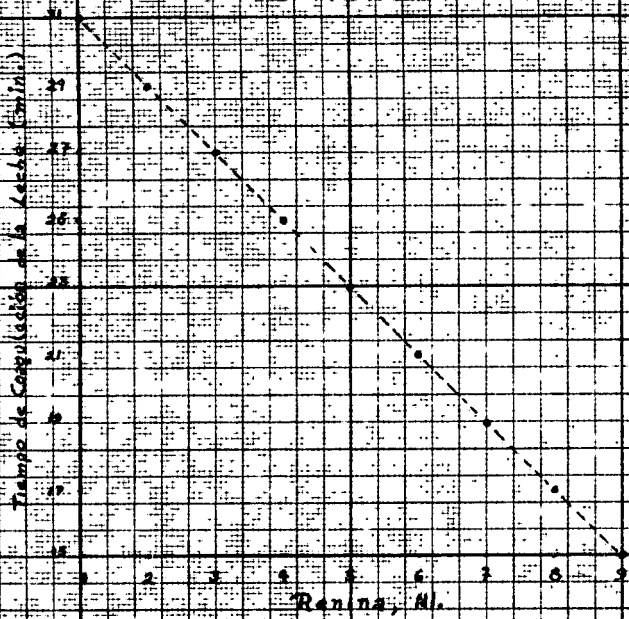
Resultados:

No hay hemólisis.

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA MUESTRA LIQUIDA PARA MEDIR
LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SOBRE LA LECHE.

No. DE MUESTRA	LECHE ml.	ENZIMA ml.	TIEMPO min.
1	50	1	31
2	50	2	29
3	50	3	27
4	50	4	25
5	50	5	23
6	50	6	21
7	50	7	19
8	50	8	17
9	50	9	15

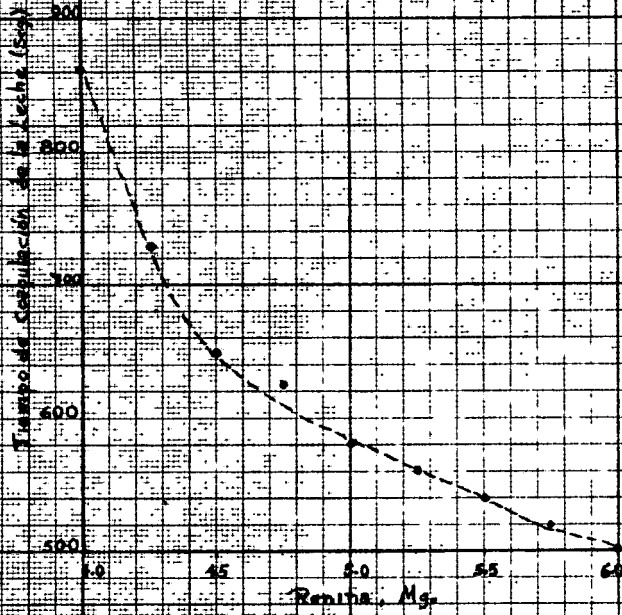
ENZIMA RENINA LIGUIDA



RESULTADOS OBTENIDOS DE LA MUESTRA LIOFILIZADA PARA MEDIR
LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA RENINA SOBRE LA LECHE.

No. DE MUESTRA	LECHE ml.	ENZIMA mgr.	TIEMPO seg.
1	50	6.00	500
2	50	5.75	520
3	50	5.50	540
4	50	5.25	560
5	50	5.00	580
6	50	4.75	632
7	50	4.50	656
8	50	4.25	732
9	50	4.00	862

ENZIMA RENINA LIOFILIZADA



VIII. CONCLUSIONS.

CONCLUSIONES

Tomando en cuenta que este producto tiene una gran demanda en nuestro País así como en el Extranjero comparándola con otras clases de enzimas, podemos sacar las siguientes conclusiones del presente estudio.

Por lo que se refiere a los parámetros realizados considero que la cuenta estándar en las placas no fueron elevadas ni se encontraron microorganismos patógenos para el hombre, sin embargo existen muestras en que se encontraron una cuenta alta, esta posiblemente se deba a la forma de tratar desde un principio la muestra, o sea que se recomienda utilizarla inmediatamente.

También hubo necesidad de buscar un método de purificación de la enzima, para mayor seguridad de los resultados obtenidos.

Además se liofilizó cierta cantidad del extracto para comparar la actividad de la enzima renina tanto de esta forma como líquida.

IX. BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA

1. Joseph L. Sardinas. Central Research División Pfizer -- Inc., Groton, Connecticut. págs. 39, 40, 41, 42, 43,44, 77.
2. José Laguna. Bioquímica. La Prensa Médica Mexicana. - pág. 52
3. Edited By Gerald Reed. Enzymes in Food Processing. - Food Science and Technology a Series of Monographs. Academic Press Inc. págs. 154-158 y 366-369
4. By J. V. Wheelock and J.P. Penney (School of Biological Sciences, University of Bradford, Yorks. BD7 1DP.UK). - Proceedings of the Biochemical Society. pág. 12p
5. By A. V. Castle and J.V. Wheelock (School of Biological Sciences, University of Bradford, Yorks, BD7 1DP.UK). - Proceedings of the Biochemical Society. págs. 12p y 13p.
6. By G. Sinkinson and J. V. Wheelock . (School of Biological Sciences, University of Bradford, Bradford. 7). Proceedings of the Biochemical Society. pág. 19p.
7. By E. J. Hindle and J. V. Wheelock (School of Biological Sciences, University of Bradford, Bradford. 7). Proceedings of the Biochemical Society. págs. 19p y 20p.
8. Bent Foltmann, Viteke Barkholt Pedersen, Henning Jacob--

- sen, Dorothy Kauffman, and Grith Wybrandt. The Complete aminoacid sequence of prochymosin. Institute of Biochemical Genetics, University of Copenhagen, Ø, Farimagsgade 2a, DK -1333 Copenhagen K, Denmark. Communicated by - - Hans Neurath, March 18, 1977. págs. 2321, 2322, 2323, - 2324.
9. Eskin, Henderson Townsend. Biochemistry of Foods. Academic Press. págs. 127, 128 y 129.
10. E.O'F. Walsh. Introducción a la Bioquímica. Editorial Acribia. pág. 77.
11. N. J. Berridge, Advances in Enzymol., 15, 423. pág.689.
12. Chester Placek Associate Editor in Collaboration with - Vincents Bavisotte and Eugene C. Jadd. Modern Chemical Processes. Paul-Lewis Laboratories, Inc., Melwaukee, - Wis. págs. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.
13. Lynch, Raphael, Mellor, Spare, Inwood. Métodos de Laboratorio. Editorial Interamericana. Segunda Edición.