



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**INMOVILIZACIÓN DE RENNINA SOBRE LA MEMBRANA DE  
CÁSCARA DE HUEVO: POTENCIAL USO COMO BIOREACTOR**

**Ana Karina Carrasco Ramos**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas

**PROFESOR GUÍA: JOSÉ LUIS ARIAS BAUTISTA**  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile  
Financiamiento Proyecto FONDECYT 1120172 y 1150681

SANTIAGO, CHILE  
2015



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**INMOVILIZACIÓN DE RENNINA SOBRE LA MEMBRANA DE  
CÁSCARA DE HUEVO: POTENCIAL USO COMO BIOREACTOR**

**Ana Karina Carrasco Ramos**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas

Nota Final: ....., .....

Prof. Guía:	José Luis Arias Bautista	Firma:
Profesor Corrector:	Soledad Fernández Garay	Firma:
Profesor Corrector:	Andrónico Neira Carrillo	Firma:

SANTIAGO, CHILE  
2015

## ÍNDICE

### I. CAPÍTULOS

a) <i>Resumen</i> .....	4
b) <i>Introducción</i> .....	6
c) <i>Revisión Bibliográfica</i> .....	8
d) <i>Hipótesis, Objetivo General y Objetivos Específicos</i> .....	12
e) <i>Materiales y Métodos</i> .....	13
f) <i>Resultados</i> .....	19
g) <i>Discusión</i> .....	25
h) <i>Conclusiones</i> .....	30
i) <i>Bibliografías</i> .....	32
j) <i>Anexos</i> .....	34

### II. FIGURAS

- <i>Nro. 1: Modelo Experimental</i> .....	13
- <i>Nro. 2: Capas de la MCH: la interna de fibras delgadas y la externa de fibras gruesas</i> .....	14
- <i>Nro. 3: Protocolo Experimental</i> .....	16
- <i>Nro. 4: Proceso de filtración de las muestras</i> .....	18
- <i>Nro. 5: Obtención de las muestras trascurridas las 18 horas en la estufa</i> .....	19
- <i>Nro.6: Obtención de los resultados luego del proceso de filtración</i> .....	20
- <i>Nro.7: Resultado promedio del cuajo, volumen de suero y leche de las nueve muestras</i> .....	20

### **III. GRÁFICOS**

- Nro. 1: Pesos promedios y desviaciones estándar de las muestras <i>E<sub>1</sub></i> , <i>C<sub>3</sub></i> y <i>C<sub>6</sub></i> .....	21
- Nro. 2: Volúmenes promedios y desviaciones estándar de las muestras <i>E<sub>1</sub></i> , <i>C<sub>3</sub></i> y <i>C<sub>6</sub></i> .....	22
- Nro. 3: Peso del cuajo y pH en la reutilización de la muestra <i>E<sub>1</sub></i> .....	23
- Nro. 4: Peso del cuajo y pH en la reutilización de la muestra <i>C<sub>3</sub></i> .....	23
- Nro. 5: Volumen de suero y pH en la reutilización de la muestra <i>E<sub>1</sub></i> .....	24
- Nro. 6: Volumen de suero y pH en la reutilización de la muestra <i>C<sub>3</sub></i> .....	24

## **RESUMEN**

La membrana de la cáscara de huevo (MCH) es una red de biopolímeros, esencialmente organizada por 2 capas de fibras entrecruzadas de proteínas (una externa y otra interna) que tienen flexibilidad en solución acuosa y son permeables al agua y a los gases. Aquí se utilizó como una bioplataforma para la inmovilización de la enzima rennina. En este estudio, la rennina se inmovilizó sobre la capa externa de la membrana de cáscara de huevo a través de adsorción por atrapamiento y luego fue tratada con glutaraldehído como agente reticulador. También se evaluó el efecto por separado de la rennina sola en ambas capas de la membrana, la rennina directamente en la leche, el glutaraldehído sobre la membrana, el glutaraldehído directamente en la leche, la membrana sola en la leche y la leche sola. Para evaluar el efecto de inmovilización enzimática se pesó el producto de la coagulación de la caseína (cuajo y suero). Se pudo observar que hubo presencia de cuajo y suero en tres casos, a saber: cuando la rennina se añadió sobre la membrana, la rennina más glutaraldehído sobre la membrana y la rennina directamente en la leche. Sin embargo no se pudo determinar si la cantidad neta de la enzima es diferente en los tres casos. Paralelamente, se reutilizó una membrana con la rennina más glutaraldehído y una membrana solo con rennina durante diez veces consecutivas, en la reutilización 9<sup>o</sup> y 10<sup>o</sup> de ambas membranas se observó una baja de pH a 4,5 logrando una coagulación ácida de la leche.

## **ABSTRACT**

The eggshell membrane (MCH) is a network of fibrous biopolymers, essentially formed by two layers of protein fibers (an external and an internal one), flexible in aqueous solution and showing water and gas permeability. It was used as a bioplatform for the immobilization of the enzyme rennin. In this study, rennin was immobilized on the outer layer of the eggshell membrane through adsorption by physical trapping and then treated with glutaraldehyde as a crosslinking agent. Separate effect of: rennin alone on both eggshell layers, rennin directly in milk, the membrane with glutaraldehyde, glutaraldehyde directly added to milk, the membrane alone in milk, and milk alone were also evaluated. To evaluate the effect of enzyme immobilization, the product of the coagulation of casein

(curds and whey) was measured. It can be noted that there was the presence of curds and whey in three cases where the rennin was added onto the membrane, the rennin on the membrane crosslinked with glutaraldehyde and, the use of rennin directly in milk. However, it was not possible to determine if the net amount of the enzyme was different in the three cases. In addition, a membrane with rennin physically adsorbed and other with rennin crosslinked with glutaraldehyde were reused for ten consecutive times. It was observed that after 9 times the pH drops down to 4.5 in such a way that the effect of rennin on the curd and whey formed is masked by the pH fall.

## INTRODUCCIÓN

Las enzimas tienen muchas aplicaciones en diversos tipos de industrias, entre las que se destaca la industria alimentaria. En algunos casos, como la obtención de yogur, o la producción de cerveza o de vino, el proceso de fermentación se debe a las enzimas presentes en los microorganismos que intervienen en el proceso de producción. Sin embargo, otros procesos de producción de alimentos, pueden realizarse mediante la acción directa de las enzimas aisladas, sin incluir a los microorganismos que las producen.

Desde hace unas décadas se dispone de enzimas relativamente puras extraídas industrialmente de bacterias y hongos, y algunas de ellas de las plantas y los animales y con una gran variedad de actividades para ser utilizadas en la elaboración de alimentos.

Actualmente, la ingeniería genética permite la biosíntesis de enzimas recombinantes de gran pureza que optimizan los procesos de producción de diversos productos. Sin embargo, su uso industrial implica la adición de enzimas al sustrato y posterior pérdida de estas por irreversibilidad. Por lo tanto, una clave para optimizar el rendimiento operativo de una enzima es la inmovilización enzimática (Klein *et al.*, 2011).

La membrana de la cáscara de huevo (MCH) es una red de biopolímeros que puede tener potenciales aplicaciones en biomedicina. Se encuentra rodeando la clara de huevo (albúmina) y por debajo de la porción mineralizada de la cáscara. Está formada por dos mallas fibrilares una interna de filamentos delgados y otra externa de filamentos gruesos (Arias *et al.*, 1991). Ambas mallas recorren juntas la mayor parte de la superficie y sólo se separan en el extremo obtuso del huevo dando origen a la cámara de aire.

Los filamentos de la MCH están compuestos de proteínas insolubles en agua (Tsai *et al.*, 2006) constituidos principalmente por colágeno tipo X y por osteopontina (Arias *et al.*, 2007). Dada la relación superficie/volumen de la MCH y su naturaleza proteica insoluble y estable, ésta ha dado lugar a diversas aplicaciones tales como material adsorbente y de inmovilización enzimática (Tsai *et al.*, 2006).

El término “enzimas inmovilizadas” se refiere a “el confinamiento físico de una enzima en una determinada región del espacio, de manera que su actividad catalítica se retenga, y pueda ser reutilizada en varias ocasiones en forma continua (Tsai et al, 2006)”.

Los principales componentes de un sistema de enzima inmovilizada son la enzima, la matriz y el modo de unión (Brena *et al.*, 2013). Existen dos métodos de unión de la enzima al sustrato: métodos reversibles y métodos irreversibles (García *et al.*, 2011).

La inmovilización de enzima sobre la membrana de la cáscara de huevo, es una técnica que se ha experimentado con otras enzimas: D-amino oxidasa, catalasa, tirosina, mirosina, ureasa y glucosa oxidasa, teniendo un rendimiento óptimo como resultado (D`Souza, *et al.*, 2013).

El propósito de este proyecto es evaluar la utilidad de la membrana de la cáscara de huevo para inmovilizar la enzima rennina sobre esta matriz, con el fin de reutilizar la rennina.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las enzimas son catalizadores biológicos que promueven la transformación química en sistemas vivos. Las enzimas tienen la capacidad de catalizar reacciones bajo condiciones suaves con un alto grado de especificidad por el sustrato. Entre las reacciones catalizadas hay una serie de transformaciones químicas muy complejas entre las macromoléculas biológicas, que no son accesibles a los métodos ordinarios de la química orgánica (Klein *et al.*, 2011).

Esto lo hace muy interesante para el uso biotecnológico. La mayoría de las enzimas son relativamente inestables y es muy difícil de mantener la enzima activa, cuando se utiliza en solución, a partir de la mezcla de reacciones después de su uso. Las enzimas pueden catalizar reacciones en diferentes estados: como moléculas individuales en solución, en agregados con otras entidades o unidas a superficies (Brena *et al.*, 2013). Esto último constituye la base de la inmovilización enzimática (Klein, *et al.*, 2011).

La rennina cuyo código es E.C.3.4.23.4, también conocida como quimosina, es una enzima que pertenece al grupo de proteínas ácidas cuya actividad se asocia a la coagulación de la leche. Es secretada por las glándulas principales (peptídicas o zimogénicas) del estómago de cerdos y abomaso de rumiantes jóvenes en sus primeros días de vida. También es llamada cuajo, el cual es utilizado en la elaboración de quesos cuya función es separar la caseína (aproximadamente el 80% del total de las proteínas) de su fase líquida (agua, proteínas del lactosuero y carbohidratos) llamado suero (Quijano, 2010).

Esta enzima se sintetiza como pre-proquimosina, proteína que tiene en su cadena 58 aminoácidos más que la quimosina activa, y que no tiene actividad proteolítica. Se secreta al estómago como pro-quimosina, también inactiva, tras el corte de 16 aminoácidos. Se transforma en una enzima activa por la eliminación proteolítica de otro fragmento de 42 aminoácidos, esto está dado por un proceso auto catalítico acelerado por el pH ácido (Quijano, 2010).

El rango de pH donde se observa la mayor estabilidad de la enzima es entre 5,3 y 6,3 y es inestable bajo 3,5 y por encima de 6,6. La rennina se vuelve inestable a temperaturas elevadas, su temperatura máxima antes de su desnaturalización es de 38 °C. La enzima, como todas las proteinasas, puede autodigerirse si se conserva en condiciones que es activa. Puesto que la rennina se inactiva reversiblemente con concentraciones elevadas de cloruro de sodio, se conserva de esta forma. Al disminuir la concentración salina al utilizarla, ésta se reactiva (Quijano, 2010).

Como consecuencia fisicoquímica de la acción de la rennina sobre las micelas de caseínas en la leche, resulta en la formación de un coágulo en la leche. Esta, en combinación con un proceso de fermentación resulta en una masa que pierde proteínas solubles y agua. Esta coagulación puede dividirse en dos partes, una primaria (hidrólisis enzimática) y otra secundaria (agregación). Durante la primera etapa, la kappa-caseína es “cortada” por la acción de la enzima en el enlace Phe<sub>105</sub> y Met<sub>106</sub>, formando una porción hidrofóbica: “para-kappacaseína” y una hidrofólica: caseína-macropéptido. En la segunda etapa, como resultado de esta acción se produce la reducción de la carga negativa neta y de la repulsión estérica, de esa manera las micelas modificadas comienzan a ser susceptibles a agregarse. Entre las fuerzas atractivas durante la agregación predominan los puentes de Ca, las fuerzas de Van der Waals, las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno (Sbodio y Revelli, 2012).

El desarrollo de las técnicas de ingeniería genética ha permitido la producción de rennina utilizando microorganismos en cuyo genoma se ha insertado el gen de la pro-rennina bovina. La cadena polipeptídica es la misma que la rennina de origen bovino, pero no está glicosilada. También, se ha llegado a producir una enzima de rennina recombinante, utilizando microorganismos como los hongos *Aspergillus niger* y *Kluyveromyces lactis* y la bacteria *Escherichia coli* (Quijano, 2010).

La inmovilización de la enzima es la solución más simple para resolver el problema de solubilidad de las proteínas. La inmovilización también mejora el control de la reacción, se evita la contaminación del producto por la misma enzima (relevante en la química de los

alimentos). Sin embargo, un sistema de inmovilización adecuado puede ser también una buena solución para muchas de las otras limitaciones enzimáticas. El acoplamiento de estabilización con la inmovilización es uno de los objetivos más frecuentes de la inmovilización. Sin embargo, una inmovilización controlada puede ser no sólo una solución para mejorar la estabilidad de la enzima, sino que también pueden reducir la inhibición de la enzima y mejorar la especificidad enzimática (García *et al.*, 2011).

Las técnicas utilizadas para la inmovilización, deben conducir a la inactivación mínima de la enzima. Además, para el éxito de la enzima, la membrana con la enzima inmovilizada, debería ser estable durante usos múltiples, también como de almacenamiento (D'Souza, *et al.*, 2013).

Existen dos métodos de unión de la enzima al sustrato: métodos reversibles y métodos irreversibles. El primero significa que una vez que el biocatalizador está unido al soporte no se puede separar sin destruir la actividad biológica de la enzima o su unión al sustrato. Los procedimientos más comunes de este tipo de inmovilización son por acoplamiento covalente, atrapamiento o microencapsulación y reticulación. Según Klein *et al.* (2011) la unión covalente tiene la ventaja principal, que la enzima no se separa de la matriz de apoyo. Por otro lado, una desventaja es el bajo rendimiento de actividad, debido a la exposición del biocatalizador a severas condiciones de reacción, lo que explica la disminución de la actividad observada en trabajos comparativos entre enzimas libres con inmovilizadas. Sin embargo, el bajo rendimiento de actividad no es un problema cuando el uso repetido de la enzima inmovilizada puede compensar esto. La segunda inmovilización de tipo irreversible, es particularmente importante para la inmovilización de enzimas lábiles y para aplicaciones en sistemas bioanalíticos. Los procedimientos más comunes son por adsorción con interacciones no covalentes (García, *et al.*, 2011).

La cáscara del huevo es una biocerámica compuesta de una fase orgánica y otra inorgánica. Químicamente está compuesta de 1,6% de agua, 95,1% de minerales, de los cuales 93,6% corresponden a carbonato de calcio en forma de calcita, 0,8% de carbonato de magnesio y 0,73% de fosfato tricálcico, y finalmente 3,3% de materia orgánica. En ella ocurre

nucleación heterogénea primaria y secundaria a partir de las mamilas (Arias *et al.*, 1991). Estructuralmente la cáscara de huevo de aves está constituida por cuatro capas, a saber: (a) Membrana de cáscara de huevo, (b) Capa mamilar, (c) Capa de empalizada y (d) Cutícula (Fernández y Arias, 2000).

Una matriz de gran interés a nivel de reutilización como recurso biológico es la membrana de la cáscara de huevo (MCH). La MCH está compuesta por fibras proteicas (biopolímeros fibrosos) que forman una membrana semipermeable, similar a una red. La MCH posee una red intrincada de fibras estables e insolubles en agua y tiene un área de alta superficie resultando en diversas aplicaciones entre otras como adsorbente. Están formadas por fibras de colágeno (colágeno tipo I, V y X, que constituyen el 88-96% de su peso seco) dispuestas en dos capas: interna y externa (Arias *et al.*, 1991). También se ha informado de la presencia de otras proteínas, tales como osteopontina y la sialoproteína (Arias *et al.*, 1991; Torres *et al.*, 2010).

Para la elaboración de productos lácteos, en este caso el queso fresco de leche entera, la leche pasteurizada tiene que estar a una temperatura de 37-39 °C (Tamine, 2011). Después viene la etapa de adición del cuajo (Rennina o Quimosina) con una dosificación que es variable, dependiendo de la fuerza del cuajo y cantidad de leche a utilizar. Por ejemplo: si al comprar el cuajo en la etiqueta dice que tiene una fuerza de 50000, esto quiere decir, que un gramo de éste cuaja 50.000 gramos de leche, esto es aproximadamente 50 litros de leche. Tras la dosificación del cuajo, la leche se agita no más de dos a tres minutos (Bylund, 2010).

El tiempo de cuajado o de coagulación es de 30 minutos a una temperatura de 37 °C. Es importante que la leche se mantenga en reposo para evitar afectar negativamente el proceso de coagulación y causar pérdidas de caseína en el lactosuero (Tamine, 2011).

En el presente proyecto se intentará inmovilizar la enzima rennina sobre la MCH, aprovechando las propiedades mecánicas de la red de biopolímeros. Esto se realizará para lograr la reutilización enzimática en la elaboración de quesos frescos industriales.

## **HIPÓTESIS**

Si, las enzimas de uso industrial son desechadas y no se vuelven a utilizar, entonces si estas se inmovilizan y no pierden su actividad, se podrían reutilizar.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la actividad de la rennina inmovilizada sobre la MCH a tiempo definido.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el efecto de la inmovilización sobre la actividad de la enzima, midiendo la cantidad de cuajo obtenido de la enzima inmovilizada a distintos tiempos.
2. Evaluar la estabilidad de la enzima, determinando su actividad al ser reutilizada varias veces, midiendo la cantidad de cuajo a un tiempo definido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este proyecto de inmovilización de la enzima rennina *in vitro*, se utilizó como matriz de apoyo la MCH para determinar el efecto de la rennina inmovilizada sobre la precipitación de las micelas de caseína. Para esto se diseñó un modelo experimental:

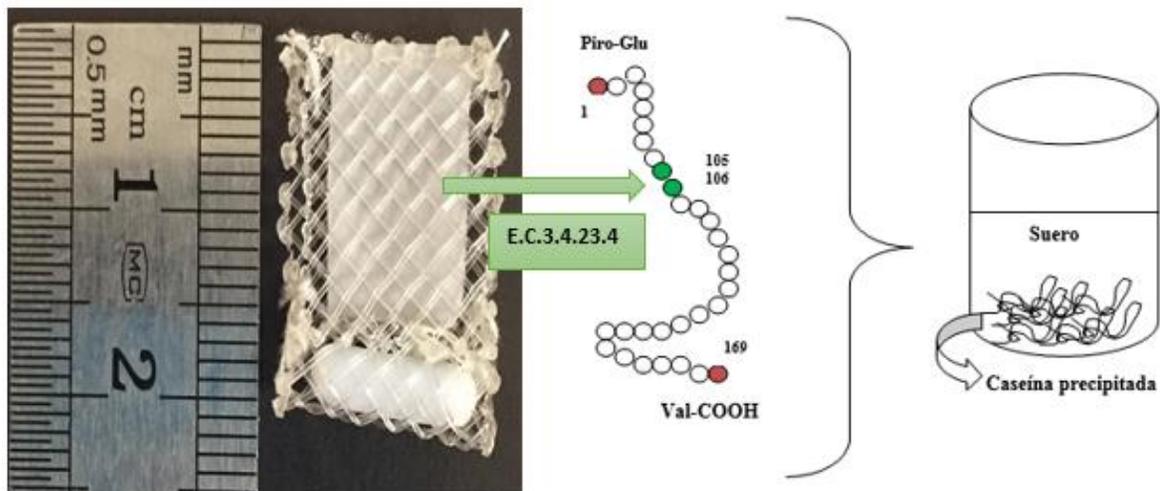


Figura Nro. 1: Modelo Experimental. La enzima rennina inmovilizada sobre la membrana de cáscara de huevo y su efecto en la  $\kappa$ -caseína.

Este diseño consistió en el uso de un soporte, el cual fue una malla de plástico color transparente de 20 mm de largo y 15 mm de ancho, donde se le adhirió un trozo de MCH de 15 mm de largo y 12 mm de ancho con la enzima rennina inmovilizada, colocando sobre ésta otro trozo de malla de plástico de 15 mm de largo y 15 mm de ancho. Para que la MCH no se desprendiera de la malla se reforzó cociendo los extremos de estas.

En el borde inferior de la malla de plástico se colocó un magneto de 15 mm de largo y 5 mm de ancho, lo que permitió hacer girar la malla sobre un agitador magnético.

Se ocupó la solución de rennina (E.C.3.4.23.4) al 4% en tampón fosfato a pH 5,8 y paralelamente se preparó una solución acuosa de glutaraldehído al 2,5 % y ácido acético al 1%.

Primero se obtuvo la MCH y luego se inmovilizó la enzima rennina sobre esta membrana con las concentraciones y soluciones que se indican a continuación:

#### Obtención de la membrana de cáscara de huevo

Se quebró un huevo en uno de sus extremos para eliminar la yema y la albúmina, luego este fue lavado con agua desionizada para eliminar los residuos de albúmina. Para desprender la MCH se añadió ácido acético al 1% (aprox. 54 ml) al interior del huevo, dejando actuar por 20 minutos. La membrana una vez extraída se lavó con agua desionizada (D'Souza, 2013) para eliminar los restos de ácido acético.

#### Inmovilización de rennina sobre la membrana de cáscara de huevo

Una vez cortada la MCH se colocó en una placa Petri de 53 mm de diámetro. Se depositó sobre ella 100 µl de rennina (SIGMA) al 4%. Después de una hora se añadió 30 µl de solución acuosa de glutaraldehído al 2,5% como agente reticulador (Figura Nro. 2). Se utilizó una varilla de vidrio para extender la solución de glutaraldehído en toda la superficie de la membrana (Zhang et al., 2006). Después de 30 minutos, la membrana se lavó en tampón fosfato a pH 5,8 durante 20 minutos.

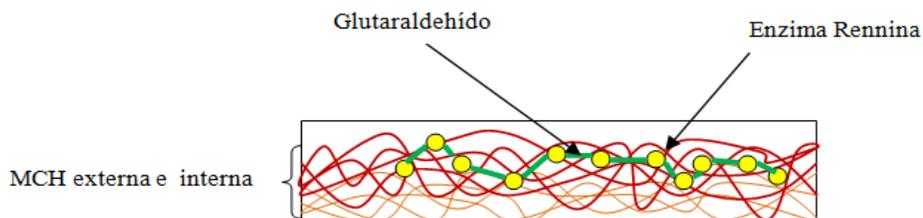


Figura Nro. 2: En la figura se muestran las dos capas de la MCH: la interna de fibras delgadas y la externa de fibras gruesas. En la capa externa de la MCH se encuentra retenida la enzima rennina y como agente reticulador el glutaraldehído.

### Protocolo Experimental

Se inmovilizó la enzima por las dos capas de la MCH; por la capa externa (C.E.) fue nombrada muestra experimental E<sub>1</sub> y por la capa interna (C.I.) se nombró muestra experimental E<sub>2</sub>. Adicionalmente, se elaboraron siete muestras controles C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> y C<sub>7</sub>. Estas muestras controles se realizaron con el fin de comprobar que la temperatura, pH y las soluciones ocupadas en la inmovilización enzimática, no tengan interacción con el producto final esperado.

Todo esto se realizó para medir el efecto de:

- MCH (C.E.) con rennina más glutaraldehído, en 10 ml de leche entera (E<sub>1</sub>).
- MCH (C. I.) con rennina más glutaraldehído, en 10 ml de leche entera (E<sub>2</sub>).
- MCH (C. I.) sólo con rennina, en 10 ml de leche entera (C<sub>1</sub>).
- MCH (C.E.) con glutaraldehído, en 10 ml de leche entera (C<sub>2</sub>).
- MCH (C.E.) sólo con rennina, en 10 ml de leche entera (C<sub>3</sub>).
- MCH en 10 ml de leche entera (C<sub>4</sub>).
- Glutaraldehído directamente en 10 ml de leche entera (C<sub>5</sub>).
- La enzima rennina directamente en 10 ml de leche entera (C<sub>6</sub>).
- Leche entera sin MCH ni soluciones (C<sub>7</sub>).

En la Figura Nro.3 observa el protocolo experimental detallando el tipo de solución, concentración y cantidad que se utilizó para cada muestra.

(Las mallas de plásticos, las MCH, la leche entera y el magneto tendrán las mismas medidas, marcas y pesos nombradas anteriormente).

Nº DE LA MUESTRA	USO DE LA MCH (C. EXTERNA)	USO DE LA MCH (C. INTERNA)	USO DE RENNINA ( $\mu$ l/1 hora)	GLUTARALDEHIO ( $\mu$ l/30 min)	TAMPÓN FOSFATO (4ml/20min)	LECHE (ml)
E <sub>1</sub>	✓		100	30	✓	10
E <sub>2</sub>		✓	100	30	✓	10
C <sub>1</sub>		✓	100		✓	10
C <sub>2</sub>	✓			30	✓	10
C <sub>3</sub>	✓		100		✓	10
C <sub>4</sub>	✓	✓			✓	10
C <sub>5</sub>				30		10
C <sub>6</sub>			100			10
C <sub>7</sub>						10

Figura Nro.3: En la figura se observa que para la muestra E<sub>1</sub> se ocupó la capa externa de la MCH y para la muestra E<sub>2</sub> se ocupó la capa interna de la MCH. Las demás muestras, son muestras controles en que se evalúa el efecto por separado de la renina sobre ambas capas de la membrana, la renina directamente en la leche, el glutaraldehído sobre la capa externa de la membrana, el glutaraldehído directamente en la leche, la membrana sin ningún tipo de solución y una frasco sólo con leche.

Posteriormente las muestras E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> más los controles C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, se adhirieron a las mallas nombradas anteriormente, para ser introducidas individualmente en un frasco (con tapa) con los 10 ml de leche entera a 37 °C. Después los frascos con sus respectivas mallas, se agitaron durante tres minutos sobre un agitador magnético, para luego dejarlos en reposo en una incubadora durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C.

Transcurridos los 30 minutos, los nueve frascos se dejaron en reposo en una estufa a una temperatura de 24 °C durante 18 horas.

Para determinar que los resultados de inmovilización de la enzima rennina sean significativos, los dos modelos experimentales más los siete controles se repitieron 10 veces en los mismos tiempos, temperatura y concentración señalada anteriormente.

#### ***Análisis cualitativo de las muestras***

Para comenzar el análisis cualitativo, se extrajeron los frascos transcurridas las 18 horas en la estufa a 24 °C, donde se determinó la presencia o ausencia de cuajo en ellos.

Posteriormente, se retiraron las mallas con sus respectivas MCH de los frascos, donde se les midió el pH al producto obtenido de ellos.

Después de esto, para realizar el proceso de separación del cuajo con el suero, se utilizó papel filtro mojado (PFM) (estimando un promedio de peso de 1,7679 g. cada papel). Cada PFM fue colocado en una probeta y bajo ésta un tubo de 10 ml. Los frascos fueron vaciados sobre los PFM y se dejó en reposo durante 18 horas (Figura Nro. 4).

Se utilizó el análisis no paramétrico de Friedman, que trata de comparar más de dos variables relacionadas (Gómez *et al.*, 2008).

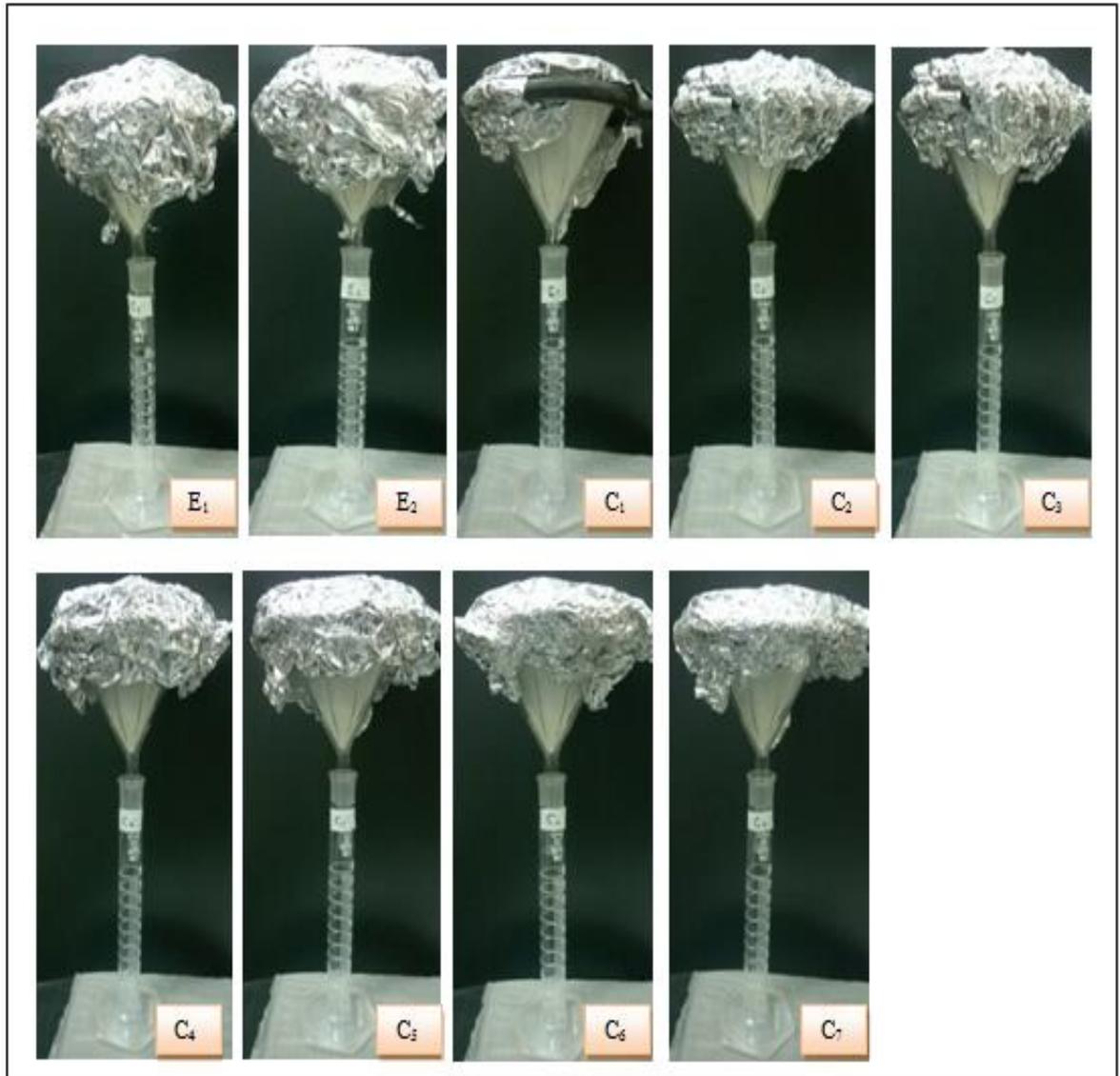


Figura Nro. 4: Muestras experimentales (E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>) y controles (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> y C<sub>7</sub>), durante el proceso de filtración en sus respectivas probetas.

Paralelamente se reutilizó una muestra experimental E<sub>1</sub> y una muestra del control C<sub>3</sub>, escogidas al azar, para evaluar el número de ciclos de la actividad enzimática inmovilizada en el tiempo, hasta que pierda su funcionalidad. Para realizar esta reutilización de membranas, se ocuparon los mismos 10 ml de leche entera, diámetro de las mallas y temperaturas nombradas anteriormente, pero sin ser reutilizadas.

## RESULTADOS

Como se muestra en la figura Nro.5, se observó que la muestra experimental E<sub>1</sub>, al igual que los controles C<sub>3</sub> y C<sub>6</sub>, si hubo coagulación de las micelas de caseína. En cambio, se observó que en las muestras experimentales E<sub>2</sub> y los controles C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> y C<sub>7</sub> no hubo formación de cuajo en ellas.



Figura Nro.5: Muestras experimentales (E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>) y los siete controles (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> y C<sub>7</sub>).

Producto del proceso de filtración, se obtuvieron cantidades variables de cuajo y suero, como se observa en la figura Nro.6.

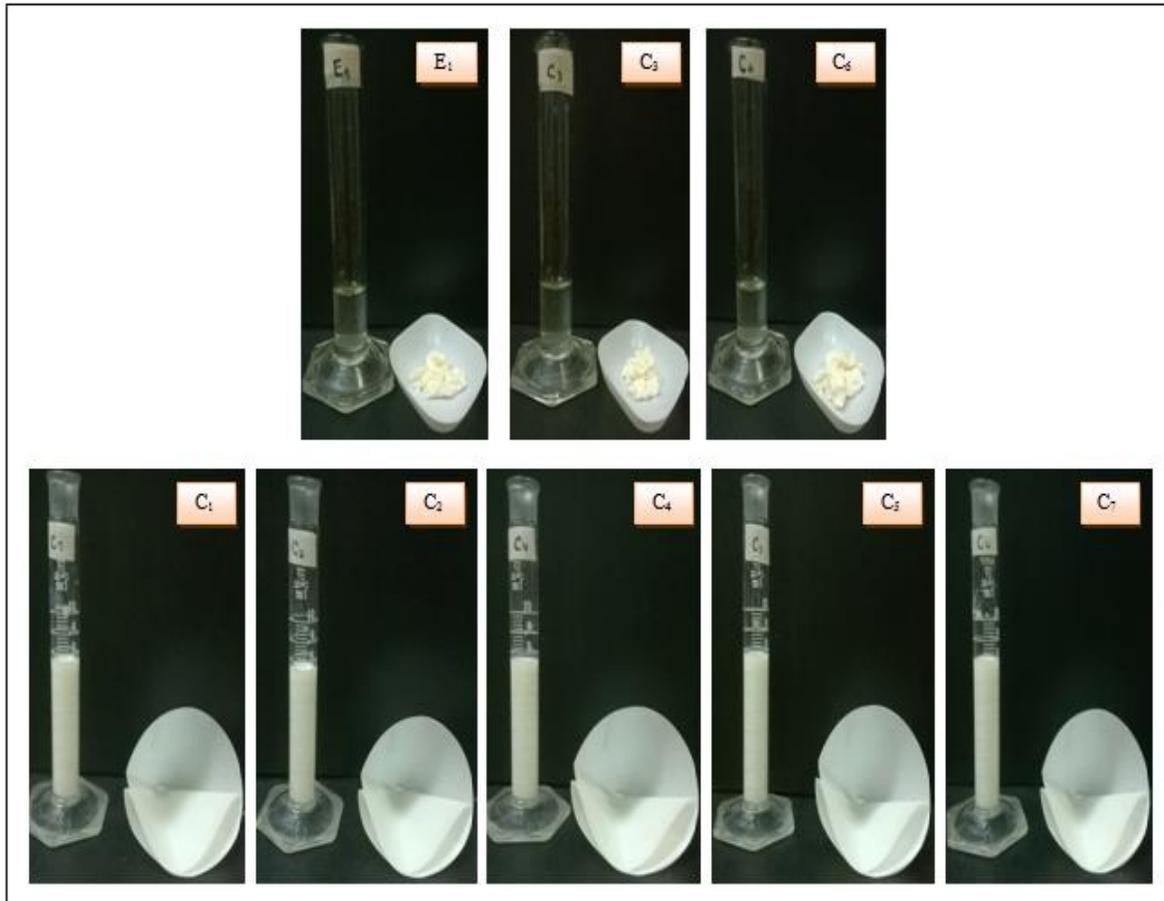


Figura Nro.6: Se observa la formación de cuajo en las muestras E<sub>1</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>6</sub>, mientras que en las muestras E<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> y C<sub>7</sub> hay presencia de leche entera.

En la figura Nro.7 se observa el promedio del cuajo, suero y leche obtenido de las diez repeticiones de las nueve muestras.

Muestra	Gramos de Cuajo	Volumen de Suero	Leche Entera
E <sub>1</sub>	3,3728 g.	4,8 ml	-
E <sub>2</sub>	-	-	8,0 ml
C <sub>1</sub>	-	-	8,1 ml
C <sub>2</sub>	-	-	8,0 ml
C <sub>3</sub>	2,7417 g.	4,2 ml	-
C <sub>4</sub>	-	-	8,1 ml
C <sub>5</sub>	-	-	8,0 ml
C <sub>6</sub>	4,4409 g.	6,5 ml	-
C <sub>7</sub>	-	-	8,1 ml

Figura Nro.7: Resultado promedio del cuajo, volumen de suero y leche de las nueve muestras.

A continuación en los gráficos Nro.1 y 2 observa el promedio y la desviación estándar de los gramos de cuajo y volumen de suero de las muestras E<sub>1</sub>, C<sub>3</sub> Y C<sub>6</sub> logrados en función del estudio realizado, mientras que en los gráficos Nro.3 y 4 se observa el promedio y la desviación estándar de los gramos de cuajo y volumen de suero obtenidos mediante la reutilización de las muestras E<sub>1</sub> y C<sub>3</sub>.

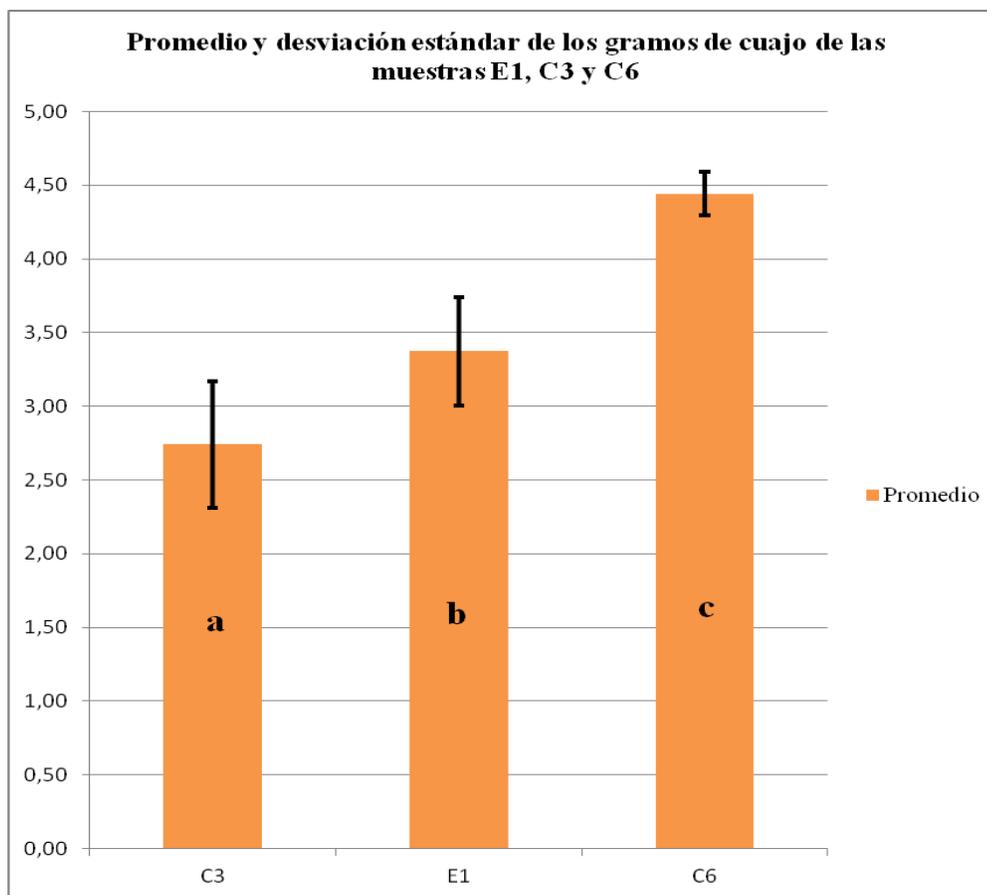


Gráfico Nro. 1: En el gráfico se observan los pesos promedios y desviaciones estándar de las muestras E<sub>1</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>6</sub>.

Lo que se puede inferir de este gráfico, es que la muestra con mayor peso promedio del cuajo es la muestra C<sub>6</sub>, le sigue en segundo lugar la muestra E<sub>1</sub> y finalmente la muestra C<sub>3</sub>. Adicionalmente, se observa que a mayor peso promedio de las muestras, menor es su desviación estándar. Con respecto a esto cabe destacar, que  $E_1 \neq C_3$ ,  $E_1 \neq C_6$  y  $C_3 \neq C_6$  lo que significaría que  $p < 0,05$  y por ende si existen diferencias significativas entre las muestras.

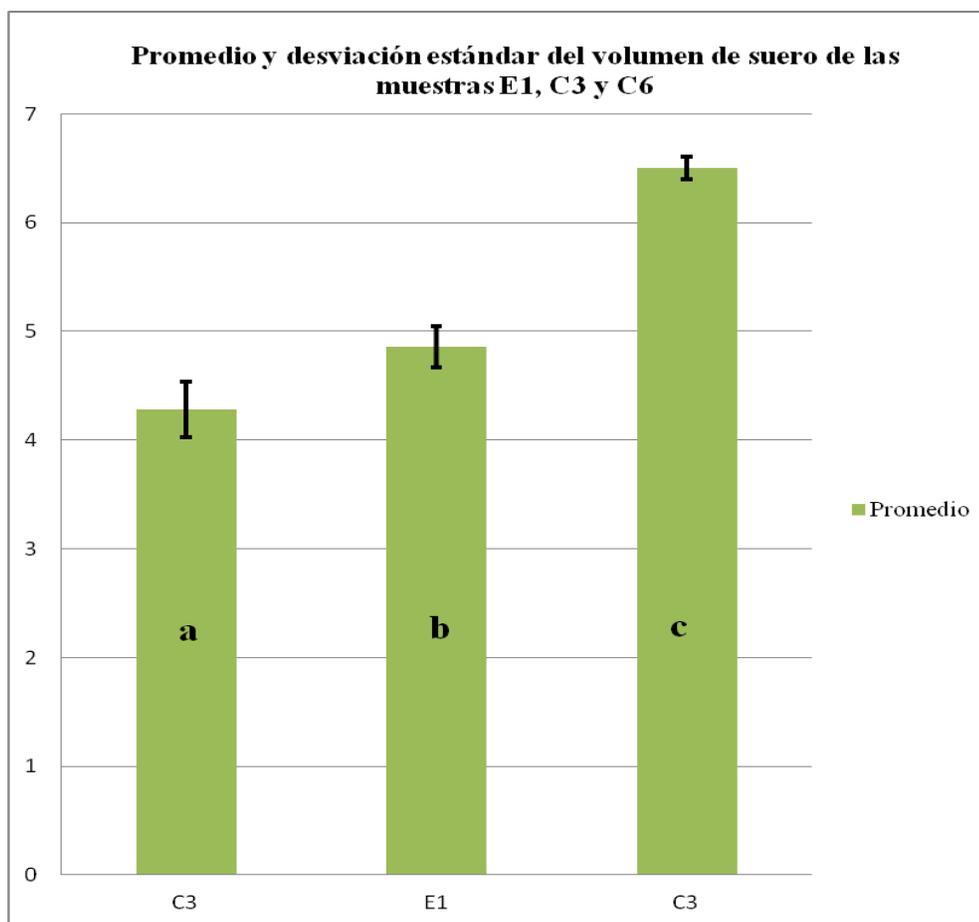


Gráfico N°ro.2: En el gráfico se observan los volúmenes promedios y desviaciones estándar de las muestras E<sub>1</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>6</sub>.

En el gráfico se muestra que el mayor peso promedio del cuajo es la muestra C<sub>6</sub>, le sigue en segundo lugar la muestra E<sub>1</sub> y finalmente la muestra C<sub>3</sub>. También se observa que a mayor peso promedio de las muestras, menor es su desviación estándar. Ahondando en lo anterior, se puede inferir que  $E_1 \neq C_3$ ,  $E_1 \neq C_6$  y  $C_3 \neq C_6$  lo que significaría que  $p < 0,05$  y por ende si existen diferencias significativas entre las muestras.

A continuación en los gráficos Nro. 3 y 4 se observa el peso del cuajo y pH de este de las diez reutilizaciones de la MCH de las muestras E<sub>1</sub> y C<sub>3</sub>, mientras en los gráficos Nro. 5 y 6 se observa el volumen de suero y pH de tales muestras.

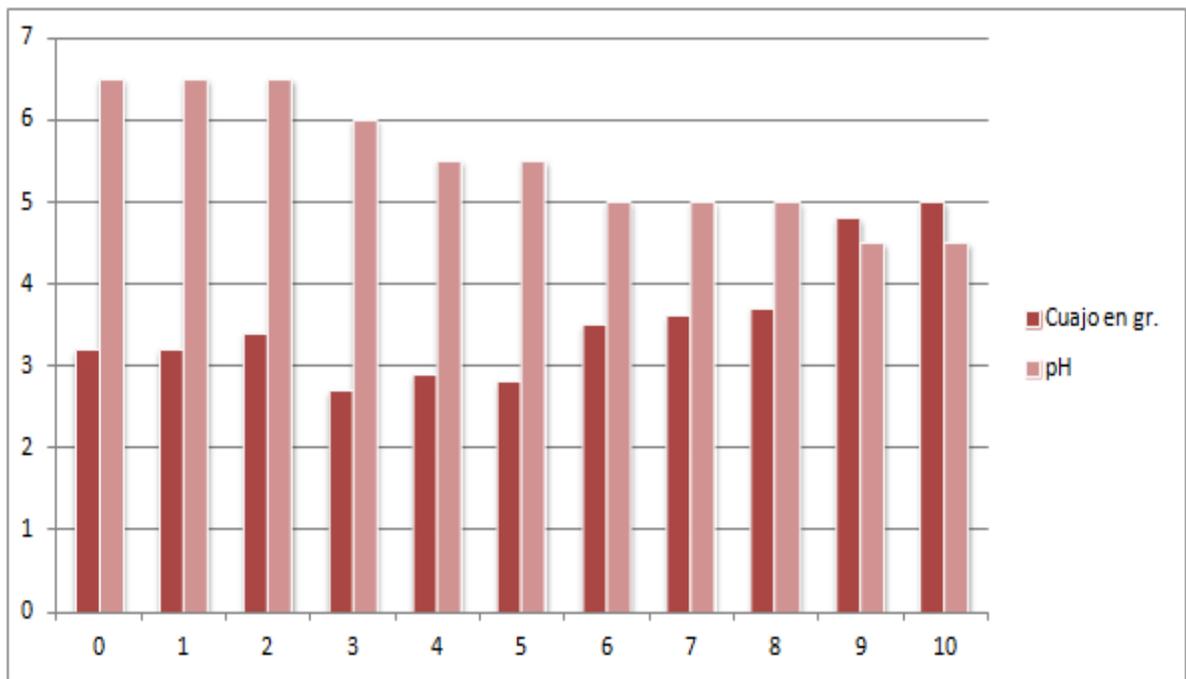


Gráfico Nro.3: En el gráfico se observa el peso del cuajo y pH de éste en la reutilización de la muestra E<sub>1</sub>.

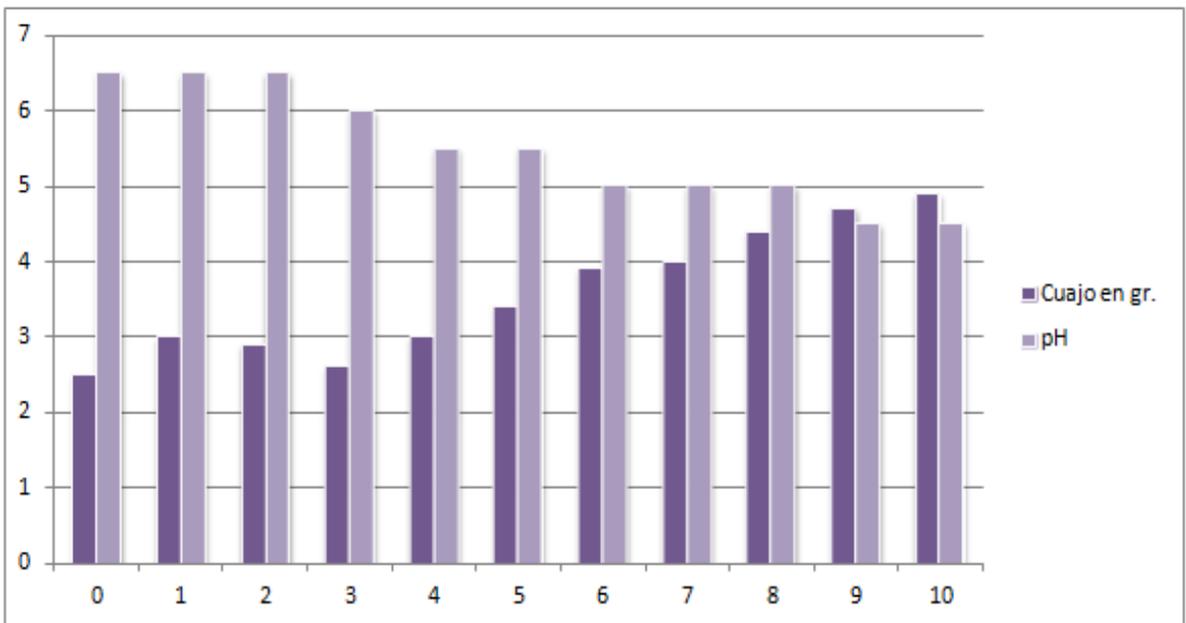


Gráfico Nro.4: En el gráfico se observa el peso del cuajo y pH de éste en la reutilización de la muestra C<sub>3</sub>.

Cabe destacar, que en la reutilización número 9<sup>o</sup> y 10<sup>o</sup> de ambas muestras (E<sub>1</sub> y C<sub>3</sub>) se obtuvo un pH de la cuajada de 4,5.

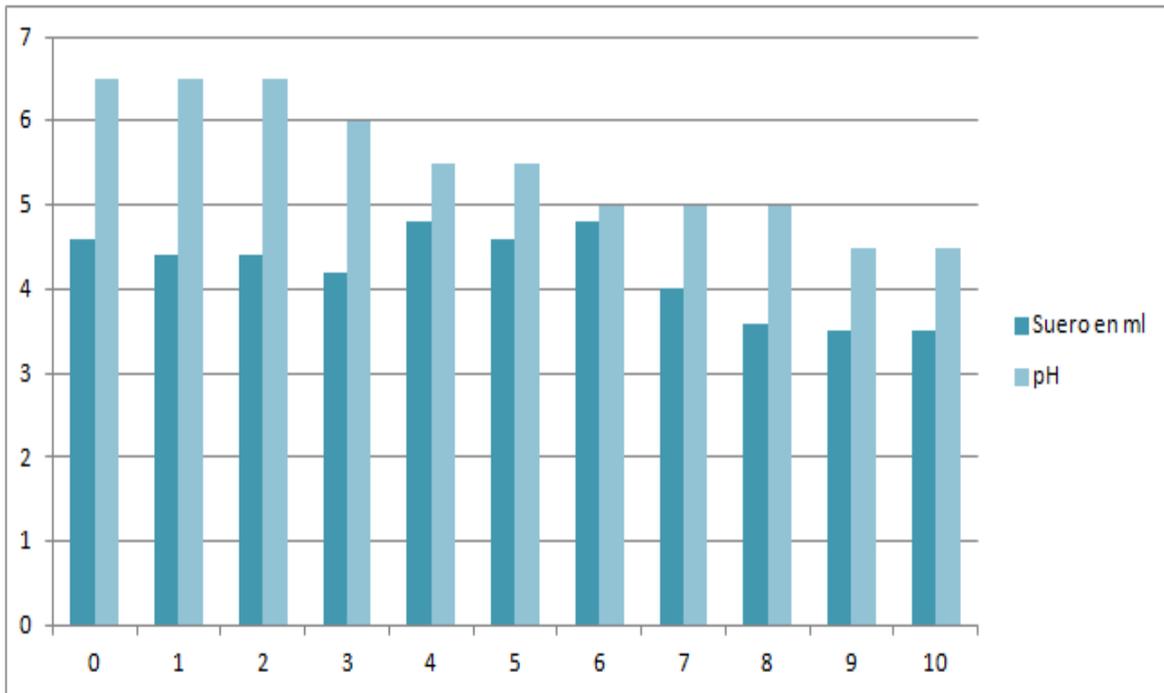


Gráfico Nro.5: En el gráfico se observa el volumen de suero y pH de éste en la reutilización de la muestra  $E_1$ .

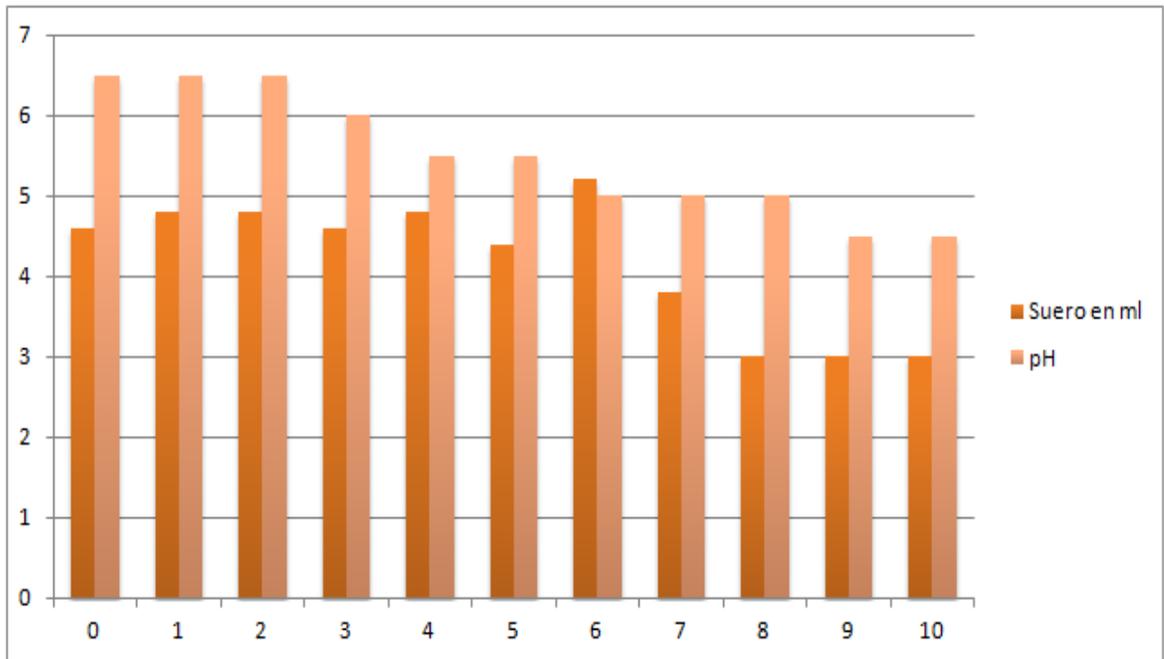


Gráfico Nro.6: En el gráfico se observa el volumen de suero y pH de éste en la reutilización de la muestra  $C_3$ .

Al determinar el pH del volumen de suero se observa que en la reutilización número 9° y 10° de ambas muestras ( $E_1$  y  $C_3$ ) hay una baja de pH a 4,5.

## DISCUSIÓN

Como producto del avance de la biotecnología y su aplicación en procesos industriales para la obtención de productos químicos, farmacéuticos o alimentarios se ha recurrido al uso de enzimas. La inestabilidad que presentan los procesos químicos industriales y la dificultad de poder separarse el sustrato del producto, todos solubles en agua, hacen que las enzimas no se puedan reutilizar. Como alternativa se ideó el método de inmovilizarlas a un soporte inerte para hacer factible que un proceso biotecnológico sea rentable, reutilizable y que la enzima no permanezca en solución al finalizar el tratamiento (Dussán, 2008).

Para lograr la inmovilización enzimática, se han descrito diferentes técnicas, tales como la adsorción física (por atrapamiento o inclusión a membrana) y la unión química (por unión a soportes y reticulado), no obstante, el más utilizado es la unión química por reticulado (Dussan, 2008). En este caso, se estudiaron 2 enfoques diferentes sobre la membrana de cáscara de huevo (MCH); la adsorción física, añadiendo la enzima sobre la MCH y la unión química por reticulado usando como reactivo bifuncional el glutaraldehído al 2,5% (Poletto *et al.*, 2011), añadiendo la enzima mas glutaraldehído sobre la MCH.

Estudios anteriores han comprobado que la MCH se han convertido en la plataforma ideal para la inmovilización de enzimas, ya que proporcionan un microambiente biocompatible alrededor de la enzima (Tembe *et al.*, 2008). Como se mencionó anteriormente, la MCH es una de tales sustratos utilizados como soporte y con la estructura de proteínas reticuladas y con una excelente permeabilidad a los sustratos y productos (Arias *et al.*, 2007).

En relación a la presente memoria, se comprobó el efecto de la coagulación de las micelas de caseína producto a la utilización de rennina más glutaraldehído sobre la capa externa de la MCH, lo cual es atribuible a la inmovilización enzimática por el método de unión química, concordando con lo descrito por López, (2007). También se demostró que este método tiene una mayor actividad enzimática en comparación a la muestra en que contenía a la rennina sin glutaraldehído sobre la MCH, lo que es de gran importancia, ya que concuerda con estudios anteriores demostrados por Dussan, (2008), en donde propone que

la enzima es adsorbida sobre un soporte, y luego si es tratada con glutaraldehído dentro de las condiciones adecuadas, todos los grupos amino primarios de la enzima y del soporte se pueden activar con una molécula de glutaraldehído. Esto permite tener un entrecruzamiento intenso dentro de las condiciones de reacción. El resultado de esta reacción son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

Por otro lado, la rennina más glutaraldehído sobre la capa interna de la MCH, no se presentó coagulación de las micelas de caseína, lo que puede deberse a que no hubo inmovilización enzimática. Dado que por la capa interna de la MCH se encuentra la membrana limitante descrita por Bellairs y Boyde (1969) y revisada por Fernández y Arias (2000).

De la misma forma, se comprobó que al usar la rennina sobre la capa interna de la MCH, no hubo coagulación de las micelas de caseína, lo que puede deberse a que no ocurrió adhesión física de la enzima sobre la membrana. Este resultado también se atribuiría a la presencia de la membrana limitante descrita por Bellairs y Boyde (1969) y revisada por Fernández y Arias (2000).

Con respecto a la membrana más glutaraldehído en la capa externa de ésta, no se produjo coagulación de las micelas de caseína, lo que puede ser debido a que las moléculas de glutaraldehído no afectarían la integridad física de las proteínas de caseínas.

En cambio, se comprobó la coagulación de las micelas de caseína en presencia de la rennina sobre la capa externa de la MCH, lo cual se le atribuye al efecto de adsorción física de la enzima sobre la membrana. Lo anterior es de gran importancia, ya que se contrapone a lo descrito por Sheldon, (2009), en donde describe que la adsorción física es generalmente demasiado débil para mantener la enzima fijada al soporte en condiciones industriales en altas concentraciones de producto y gran fuerza iónica.

Con respecto a la MCH en la leche, no hubo presencia se coagulación de las micelas de caseínas, esto puede deberse a que no existió interacción entre la MCH con las proteínas de caseína de la leche.

También se observó la falta de coagulación de las micelas de caseína en presencia del glutaraldehído en la leche. Esto se debería a que la molécula de glutaraldehído por sí sola no afecta la conformación física de las proteínas de caseína.

Adicionalmente agregando rennina sobre la leche se produjo el efecto de coagulación de las micelas de caseína, este resultado obtenido confirma lo descrito por Sbodio y Revelli, (2012), quienes mencionan que la rennina rompe los enlaces peptídicos de la caseína, entre la fenilalanina y metionina, desprendiendo pequeños segmentos de esta y la completa precipitación de la micela.

Por último, no se observó coagulación de las micelas de caseínas cuando se tenía leche sola en la muestra, lo que concuerda con lo mencionado por Bylund, (2010), en el que describe la temperatura de pasteurización es de 37-39 °C.

Adicionalmente se demostró lo descrito por Quijano, (2010), afirmando que el pH óptimo de la caseína es de 5,8 e inestable bajo 5,0.

Mediante la reutilización en el tiempo de la membrana con la rennina inmovilizada, ya sea por el método de unión química o adsorción física, se comprueba la presencia de coagulación de las micelas de caseínas. Esto puede deberse a que mediante la inmovilización enzimática la enzima no pierde su actividad de interacción con el sustrato o con la MCH y tiene mayor resistencia a la inactivación en comparación a la enzima sin inmovilizar, lo que concuerda a lo descrito por Dussan, (2008). Sin embargo, a medida que aumenta la reutilización de las membranas, se aprecia una coagulación ácida (pH de 4,5), descartando las muestras con este pH dentro de los resultados significativos, ya que como se mencionó anteriormente el rango de estabilidad de la caseína varía entre 6,6 – 5,0 (Quijano, 2010). Lo anterior es de gran importancia, ya que si se adiciona ácido a la leche,

la carga negativa de la cara externa de la micela se neutraliza (los grupos fosfatos se protonan) y la proteína neutra se precipita (Sbodio y Revelli, 2012). Esto puede deberse a que como la MCH se encuentra dispuesta en dos capas, formando ambas un entramado fibrilar (Fernández y Arias, 2000), en la reutilización de ésta podrían quedar restos de micelas de caseína, siendo este un factor predisponente para el crecimiento de bacterias. Con este crecimiento de bacterias va asociado a la producción de ácido láctico llegando a producir esta la misma reacción de la coagulación ácida (Sbodio y Revelli, 2012). Unas posibles soluciones para contrarrestar el efecto de la coagulación ácida, es utilizar un buffer de pH alcalino o un antimicrobiano, pero cabe destacar que al utilizarlos no elaboraríamos un producto inocuo para el consumo humano.

Las diferencias existentes entre los métodos de inmovilización enzimática (unión química y adsorción física) sobre la capa externa de la MCH y la rennina directamente en contacto con la leche entera, se debería a que si a la rennina se le añade glutaraldehído comienza a formar enlaces intermoleculares irreversibles, formando un vínculo intenso entre la MCH-glutaraldehído-rennina, teniendo esto la ventaja de que la enzima no pueda ser retirada de la superficie de la membrana fácilmente. Este tipo de unión es capaz de aumentar la estabilidad de la rennina y mantener su actividad en el tiempo (Dussan, 2008), mientras tanto si la rennina es retenida físicamente en el entramado fibrilar de la MCH, esta adhesión es demasiado débil para mantener la enzima fijada a la MCH y mantener su actividad en el tiempo (Sheldona, 2009). Por otra parte, cuando la rennina se encuentra libre, sin ser colocada sobre la MCH, conserva el 100% de su actividad enzimática (Sbodio y Revelli, 2012).

La similitud de efectos en la rennina más glutaraldehído sobre la MCH comparada con la rennina sin glutaraldehído sobre la MCH, indicaría que la rennina sin glutaraldehído sobre la MCH conserva su actividad casi igualando a la muestra con la rennina más glutaraldehído sobre la MCH. Esto se contradeciría a lo descrito por Sheldona, (2009), quien propone que la adsorción física es demasiado débil para mantener a la enzima fijada a un soporte, y se reafirma lo mencionado por Tembe *et al.*, (2008), quienes proponen que la

MCH es una bioplataforma para la inmovilización de enzimas gracias a su red fibrosa, siendo de excelente uso para atrapar a la enzima en su entramado fibrilar.

## CONCLUSIONES

La membrana de cáscara de huevo (MCH) resultó ser un excelente soporte para la inmovilización de la rennina por primera vez. Gracias a esto, se podría crear un producto mucho más puro en la elaboración de quesos.

Para este estudio de inmovilización enzimática, se consideró el método de unión química y adsorción física. En relación a los métodos utilizados, es importante mencionar que el método de unión química, o sea la rennina más glutaraldehído sobre la MCH, demostró ser un método de alta eficiencia en conservar la actividad y estabilidad de la enzima. Por otro lado, la adsorción física, o sea la rennina sin glutaraldehído sobre la MCH, constituyó ser un buen método de inmovilización enzimática, mostrando que la estructura de la MCH es un excelente elemento para retener enzimas y que estas conserven su actividad. Ahondando en esto último, se comprobó que el método de unión química conserva mayor actividad de la enzima que el método de adsorción física.

La aparición de cuajo en las muestras con la rennina directamente en la leche, la rennina más glutaraldehído sobre la MCH y la rennina sin glutaraldehído sobre la MCH, reflejaron la gran influencia que tiene la enzima en el proceso de cortar los enlaces de la caseína y lograr la posterior precipitación de ésta y formar una coagulación de la leche. Así mismo, los diferentes métodos de inmovilización enzimática y la adición de la rennina en su forma libre, demostró ser un factor capaz de influir fuertemente en el peso promedio de los gramos de cuajo y volúmenes de suero obtenidos. Si bien en un comienzo se esperaba obtener coagulación de la caseína sólo por el método de unión química y añadiendo a la rennina directamente en la leche, la presencia de la rennina retenida por atrapamiento (adsorción física) en el entramado fibrilar de la MCH demostró tener reacción ante la caseína, casi igualándose a la método de unión química. En este sentido, se observó que en primer lugar, en cuanto a peso promedio de la cuajada y volumen de suero, se encuentra la rennina directamente en la leche, en segundo lugar la rennina más glutaraldehído sobre la MCH y en tercer lugar la rennina sin glutaraldehído sobre la MCH, lo que da cuenta a que hubieron diferencias significativas entre las muestras.

Por otro lado, la reutilización de las MCH con la rennina más glutaraldehído y la MCH con rennina sin glutaraldehído, demuestran que la rennina conserva su actividad y estabilidad enzimática por un tiempo de 10 reutilizaciones, comprobándose por formación de la cuajada de la leche.

Una de las desventajas de este proyecto, es que ante una posible contaminación bacteriana en la reutilización de la MCH, mencionado en la discusión, no se pudo estimar en cuanto aumenta el producto debido a la coagulación ácida, sin descartar que aún la rennina mantiene su actividad. Ante esto, habría que crear nuevas alternativas para poder diferenciar cuanto influye la coagulación ácida en el producto. Por otro lado, una ventaja de la reutilización de las MCH, es que la enzima no permanece en la leche al finalizar el tratamiento y así permitir un reciclado de esta, aumentando la pureza del producto.

En resumen, en la presente memoria de título se demostró que se puede inmovilizar rennina sobre la MCH, sin embargo su actividad es menor que la rennina añadida directamente en solución. Por otro lado, no sabemos si tenemos una concentración equivalente de enzima en todas las muestras. También se comprueba que la reutilización de la MCH con la rennina inmovilizada, se mantiene la actividad de ésta al menos por 10 reutilizaciones.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**ARIAS, J.L., FERNANDEZ, M.S., DENNIS, J.E., CAPLAN, A.I.** 1991. Collagens of the chicken eggshell membranes. *Connect. Tissue Res.* 26:37-45.

**ARIAS, J.; MANN, K.; NYS, Y.; GARCÍA, J.; FERNANDEZ, M.** 2007. Eggshell Growth and Matrix Macromolecules. *In: Handbook of Biomineralization.* Weinheim, Germany (1):309-328.

**BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F.** 2013. Immobilization of enzymes: a literature survey. *Methods Mol. Biol.* 1051:15-31.

**BYLUND, G.** 2010. Cheese, tradition and basic knowledge. *In: dairy processing handbook.* 1ª ed. AMV Edition Anthony Madrid. Spain. pp. 292-300.

**D`SOUZA, S.; KUMAR, J.; KUMAR, S.; KUBAL, B.** 2013. Immobilization of the urease on eggshell membrane and its application in biosensor. *Materials Science and Engineering C* (33):850-854.

**DUSSAN, K.** 2008. Inmovilización enzimática. Inmovilización de enzimas en nanoestructuras magnéticas para aplicaciones industriales. (4):45-47.

**FERNANDEZ, M.; ARIAS, J.L.** 2000. La cáscara del huevo: Un modelo de biomineralización. *Monografías de Medicina Veterinaria.* Santiago, Chile. 20: 50-60.

**GARCÍA, C.; BERENGUER, A.; FERNÁNDEZ, R. RODRIGUEZ, R.** 2011. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Adv. Synth* (3): 2885 – 2904.

**GÓMEZ, M.; DANGLLOT, C.; VEGA, V.** 2008. Sinopsis de pruebas estadísticas no paramétricas. Cuando usarlas. *Sociedad Mexicana de Pediatría* 70(2): 96-97.

**POLETTI, M.; WEBER, C.; SOIBELMANN, A., DUPONY, J.; FRAZZON, J.; HERTZ, F.** 2011. Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization. *Process Biochemistry* (46): 1375-1379.

**QUIJANO, J.** 2010. Quimosinas. *Revista Reciteia.* Cali, Colombia 10(1):5-12.

**KLEIN, M.P.; SCHEEREN, C.W.; GLOCK, A.S.; DUPONT, J.; FRAZZON, J.; HERTZ, P.** 2011. Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization. *Process Biochemistry* (46):1375–1379.

**LOPEZ, C.** 2007. Desarrollo de nuevos catalizadores enzimáticos para la producción directa de cefalosporinas semisintéticas a partir de cefalosporina C. Universidad Atónoma de Madrid. Madrid, España. pp. 15-17.

**SBODIO, O.A.; REVELLI, G.R.** 2012. Coagulación de la leche. Desarrollo de un dispositivo para el “monitoreo” online del proceso. Instituto de Tecnología de Alimentos. Santiago, Chile. pp. 3-4.

**SHELDON, R.** 2009. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. Adv. Synth. Catal (349):1289 – 1307.

**TAMIME, A.Y.** 2011. Processed Cheese and Analogues: An overview. In: Processed Cheese and Analogues. 1º ed. Blackwell Publishing Ltd. pp. 45-57.

**TEMBE, S.; KUBAL, B.; KARVE, M.; DSOUZA, S.** 2008. Glutaraldehyde activated eggshell membrane for immobilization of tyrosinase from *Amorphophallus companulatus*: Application in construction of electrochemical biosensor for dopamine. Science Direct (612): 212-217.

**TORRES, F.G.; TRONCOSO, O.P.; PIAGGIO, F.; HIJAR, A.** 2010. Structure–property relationships of a biopolymer network: The eggshell membrane. Acta Biomaterialia (6): 3687–3693.

**TSAI, W.T.; YANG, J.M.; LAI, C.W.; CHENG, Y.H.; LIN, C.C.; YEH, C.W.** 2006. Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. Bioresource Technology (97): 488–493.

**ZHANG, G.; LIU, D.; SHUANG, S.; CHOI, M.** 2006. A homocysteine biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilization platform. Sensors and Actuators B. (114): 936–942.

# ANEXO

## CARTA GANTT

ACTIVIDADES	SEMANAS																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Estudio teórico Inmovilización Enzimática	█	█	█	█																				
Entrega anteproyecto					█																			
Fase experimental						█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█						
Análisis de los resultados							█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█				
Entrega 1 <sup>er</sup> avance													█											
Presentación avances														█										
Entrega 2 <sup>o</sup> avance																						█		
Presentación final																								█