



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



ESTABLECIMIENTO DEL METODO DE OBTENCION DEL
EXTRACTO CRUDO DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA A
PARTIR DE UNA CEPA SILVESTRE DE *Aspergillus niger*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
MARIA DE LOURDES BAHENA GUTIERREZ

DIRECTOR DE TESIS: MVZ. ENRIQUE SALAS TELLEZ
ASESORES: Ph.D. ROBERTO CERVANTES OLIVARES
MenC. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO,

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE:	PAG.
INDICE DE CUADROS	2
INDICE DE GRAFICAS	3
RESUMEN	4
1 INTRODUCCION	5
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAL Y METODOS	24
3.1 CEPA EMPLEADA	24
3.2 CULTIVO DE <u>A. niger</u>	24
3.3 OBTENCION DE EXTRACTO CELULAR	25
3.3.1 ROMPIMIENTO QUIMICO	25
3.3.2 ROMPIMIENTO MECANICO	26
3.3.3 ROMPIMIENTO FISICO	27
3.4 MEDIOS DE CULTIVO	28
3.5 EFECTO DE LA VARIACION DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA PRODUCCION DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA, PESO SECO Y CONSUMO DE CARBOHIDRATOS A PARTIR LA CEPA SILVESTRE DE <u>A. niger</u> .	31
3.5.1 METODOS ANALITICOS	32
4 RESULTADOS	36
5 DISCUSION	56
6 CONCLUSIONES	61
APENDICE	62
BIBLIOGRAFIA	65

INDICE DE CUADROS

	pág
CUADRO No 1 ENZIMAS Y METABOLITOS PRODUCIDOS POR <u>A. niger.</u>	21
CUADRO No 2 PROPIEDADES DE LA ENZIMA GOD PROVENIENTE DE DIFERENTES HONGOS.	22
CUADRO No 3 MEDIO DE INOCULO DENOMINADO YPG	28
CUADRO No 4 MEDIO DE ZETELAKI Y MEDIOS MODIFICADOS DE ZETELAKI	30
CUADRO No 5 DIFERENTES METODOS DE ROMPIMIENTO DEL MICELIO DE <u>A. niger.</u> Y TIEMPO DE PROCESO	40
CUADRO No 6 PRODUCCION DE GOD A DIFERENTES pH'S A PARTIR DE LA CEPA SILVESTRE DE <u>A. niger.</u>	41
CUADRO No 7 ACTIVIDAD ESPECIFICA Y ACTIVIDAD VOLUMETRICA pH 6 MEDIO (GLUCOSA-MIEL DE MAIZ)	42
CUADRO No 8 ACTIVIDAD ESPECIFICA Y ACTIVIDAD VOLUMETRICA pH 6 MEDIO (GLUCOSA)	43
CUADRO No 9 ACTIVIDAD ESPECIFICA Y ACTIVIDAD VOLUMETRICA pH 6 MEDIO (MIEL DE MAIZ)	44
CUADRO No 10 ACTIVIDAD ESPECIFICA Y ACTIVIDAD VOLUMETRICA pH 7 MEDIO (GLUCOSA- MIEL DE MAIZ)	45
FIGURA No 1 HONGO	20
FIGURA No 2 METODOLOGIA	29
FIGURA No 3 TIPO PRENSA FRANCESA	34
FIGURA No 4 FERMENTADOR	35

INDICE DE GRAFICAS

	pág
GRAFICA 1 INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO EN DIFERENTES MEDIOS EN LA OBTENCION DEL PESO SECO DE <u>A. niger.</u>	46
GRAFICA 2 RELACION DEL PESO SECO Y ACTIVIDAD DE GOD EN EL MEDIO A (GLUCOSA-MIEL DE MAIZ) pH 6 DURANTE EL CRECIMIENTO DE <u>A. niger.</u>	47
GRAFICA 3 RELACION DEL PESO SECO Y ACTIVIDAD DE GOD EN EL MEDIO A (GLUCOSA-MIEL DE MAIZ) pH 7 DURANTE EL CRECIMIENTO DE <u>A. niger.</u>	48
GRAFICA 4 RELACION DEL PESO SECO Y ACTIVIDAD DE GOD EN EL MEDIO B (GLUCOSA) pH 6 DURANTE EL CRECIMIENTO DE <u>A. niger.</u>	49
GRAFICA 5 RELACION DEL PESO SECO Y ACTIVIDAD DE GOD EN EL MEDIO C (MIEL DE MAIZ) pH 6 DURANTE EL CRECIMIENTO DE <u>A. niger.</u>	50
GRAFICA 6 COMPORTAMIENTO DE ACTIVIDAD DE GOD DE <u>A. niger.</u> EN DIFERENTES MEDIOS	51
GRAFICA 7 CONSUMO DE CARBOHIDRATOS EN EL MEDIO A (GLUCOSA-MIEL DE MAIZ) pH 6 DE <u>A. niger.</u>	52
GRAFICA 8 CONSUMO DE CARBOHIDRATOS EN EL MEDIO B (GLUCOSA) pH 6 DE <u>A. niger.</u>	53
GRAFICA 9 CONSUMO DE CARBOHIDRATOS EN EL MEDIO C (MIEL DE MAIZ) pH 6 DE <u>A. niger.</u>	54
GRAFICA 10 ACTIVIDAD DE GOD DE <u>A. niger</u> EN DIFERENTES MEDIOS	55

RESUMEN

En el presente trabajo se obtuvo la producción de glucosa oxidasa a partir de una cepa silvestre de Aspergillus niger. Se probaron diferentes formas de liberación de la enzima en el micelio de A niger.

Una vez que se obtuvo el mejor método de liberación de la enzima se hicieron cultivos por lotes en el medio A con fuente de carbono (glucosa-miel de maíz), medio B (glucosa) y medio C (miel de maíz).

Se detecto la producción de la enzima glucosa oxidasa a través de un método espectrofotométrico. La mayor actividad específica de la GOD se obtuvo en extracto crudo del micelio de A. niger cultivado en el medio A (glucosa-miel de maíz), utilizando el tubo tembruck como método de liberación.

1 INTRODUCCION

Los primeros indicios de la biotecnología se tienen desde el año 6000 A.C en Babilonia con la fabricación de una bebida semejante a la cerveza, los siguientes datos que se tienen son finales del siglo XVII sobre la industria del pan, leche fermentada, quesos, cerveza y vino.(6) En el siglo XIX se reconoció la participación de las levaduras en el proceso de la cerveza; en los últimos años de este siglo se utilizó al etanol como producto de fermentación en procesos de combustión.(6)

A principios de este siglo se inicia el tratamiento de aguas con una planta digestora anaeróbica y se implanta un método de producción de ácido cítrico de A. niger cultivado en superficie. Durante la Guerra Mundial de 1914 -1918 se inició el avance de la biotecnología debido a la necesidad económica de satisfacer otro tipo de demandas como la producción de glicerol, para la manufactura de nitroglicerina. En la segunda Guerra Mundial la biotecnología obtuvo un impulso importante debido a que se inició la producción comercial de penicilinas; siendo esta etapa de importancia porque en ella se fijaron las condiciones de desarrollo tecnológico empleando microorganismos dentro de un medio aséptico.

En 1944 la producción de estreptomycina por Waskman, dió la pauta de utilizar microorganismos del suelo, de aquí la producción de una gran cantidad de compuestos obtenidos de los estreptomycetos (6,36). Desde la década de los cuarenta del presente siglo, se han obtenido numerosos productos a

partir de microorganismos: como antibióticos, diferentes aminoácidos, nucleótidos, enzimas, vitaminas y hormonas.(37) Los organismos adecuados para ser usados en la producción de las enzima son los que, tienen la capacidad de crecer con rapidez en fermentadores con nutrientes sencillos (22, 38).

La biotecnología para optimizar los procesos de producción de enzimas pone especial atención al mejoramiento de microorganismos. Para la biotecnología es esencial la modificación de cepas; pero para lograr lo anterior es importante comprender los principios de regulación de síntesis de proteínas y de la actividad enzimática.

Los hongos son un grupo de organismos eucariotes que poseen núcleos organizados, cuya membrana nuclear esta bien definida. Al igual que otros eucariotes, los hongos poseen mitocondrias y sistema endomembranoso (retículo endoplásmico y aparato de Golgi).(2) La membrana celular basal está organizada y contiene una gran cantidad de esteroides, propiedad que los hace diferentes a otros microorganismos, en análisis físicoquímico de la pared celular libre de citoplasma, se ha encontrado contiene un 80 a 90 % de polisacáridos y el resto son proteínas y lípidos.(5) En contraste las bacterias están formadas por derivados N-acetil murámico y N-acetil neuramínico, los vegetales por celulosa y derivados y los insectos y crustáceos por quitina. (5) Los hongos tienen propiedades biológicas que se extienden hacia todos los campos. Los hay altamente infecciosos o tóxicos, tanto para el hombre como para los animales; otros

por el contrario, constituyen la base de una gran cantidad de procesos industriales, estos tienen una gran importancia en la producción comercial de ácidos orgánicos, preparaciones vitamínicas, enzimas y de sustancias antimicrobianas ó antifúngicas. Otro grupo se caracteriza por dañar la materia orgánica (alimentos, tejidos, cuero y otros artículos). Por último unos pocos se les emplea como alimento. (8)

1.1 FUENTES DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA (GOD).

La enzima GOD se reporta que esta presente en la miel de abeja y una alga roja Iridopphyucus flaccidum (3).

La enzima GOD se ha encontrado en bacterias del género de Pseudomonas, Acetobacter y Bacillus: Acetobacter acetii, A. orleanense, A. gluconicum; Bacillus xilenus, B. oxidans, B. viniacetii, B. ascenden y B. hoshigaki.

También la enzima es obtenida de los géneros de hongos Penicillium y Aspergillus: Penicillium chrysogenum, P. leteu, P. purpurogenum, P. parpegenum, P. glaucum, Penicillium notatum, Penicillium amagasakiense y Penicillium vitale (estos tres últimos han producido la enzima en fermentadores. (11, 21, 30)) y además Aspergillus niger, A. oryzae y A. glaucus.

Las enzimas del Penicillium son excretadas al medio lo que facilita su obtención ya que de esta manera no hay que romper al microorganismo para poder obtener la enzima.

Otras investigaciones indican que las especies del género Penicillium tienen la tendencia de autolizarse más

rápidamente en comparación que las especies del género Aspergillus. (18,26)

El mejor productor que hasta ahora se ha encontrado ha sido una cepa de Penicillium purpurogenum el cual bajo condiciones óptimas de cultivo ha producido la enzima con una actividad de 25,000 unidades Sarett por litro, además de requerir tres días para su crecimiento. (26)

La composición del medio de cultivo para el Penicillium purpurogenum que contiene urea y nitratos resulta ser mejor en la producción de la enzima GOD que las sales de amonio y el nitrógeno de origen orgánico. Al contener el medio melazas como fuente de carbono y pH alcalino se obtiene una buena producción de enzima, además que no se requiere el empleo de caseína de polipeptona o carne de soya hidrolizada. No se ha seguido trabajando con esta especie porque se ha detectado que excreta una toxina al medio de cultivo (25). Por otro lado el Penicillium chrysogenum produce la enzima GOD en la superficie del medio al igual que el Penicillium amagasakiense, y no en cultivo sumergido como otros géneros de hongos. El Penicillium chrysogenum con un medio de cultivo con melazas que no se le dió una clarificación no presento actividad de la enzima, por lo que requiere necesariamente glucosa o sacarosa, además de una fuente adicional de nitrógeno. (18,26) También se ha encontrado que se inhibe la formación de enzima en presencia de una fuente de nitrógeno compuesta por sales de amonio ó nitrato de sodio. (26)

En cultivos ligninolíticos de Phanaerochaete chrysosporium, se ha detectado la presencia de *GOD*, cuando se adiciona glucosa al medio, presentando un peso molecular de 180,000 en su apariencia nativa además de ser un importante aportador de H_2O_2 , para la degradación de lignina.(12)

Recientemente se ha identificado un metabolito en el medio filtrado de Talaromyces flavus como *GOD*, presentando esta actividad cuando se adiciona glucosa con la producción de peróxido de hidrógeno por la reacción que cataliza esta enzima, jugando un papel importante como biocontrolador de Vertucillium dahliae.(13)

1.2 UTILIDADES DE LA GLUCOSA-OXIDASA.

La enzima *GOD*, tiene varias aplicaciones tanto en el procesamiento de alimentos y el área clínica, por la reacción en la que participa y que cataliza.

La oxidación espontánea de los alimentos por el oxígeno atmosférico o disuelto constituye con frecuencia un problema que da lugar a pérdidas en el valor nutritivo y calidad organoléptica de un producto y a la formación de toxinas (37), la enzima *GOD* tiene gran aplicación en el área alimentaria, como un antioxidante, para prevenir cambios en el color, aroma y sabor de los alimentos durante su procesamiento, transporte y almacenamiento, por ejemplo estabilización de jugos enlatados basados en cítricos, prevención del cambio de color en el vino y que este se convierta en vinagre, prevención del cambio de color de

camarones congelados que se oxidan facilmente al contacto con el aire, al igual que previene el oscurecimiento enzimático de fruta congelada como el durazno, desoxigenación de la cerveza y salsas; como protector de la oxidación de la grasa animal, así como una gran variedad de alimentos secos como las mezclas de repostería y a las sopas instantáneas (14,25); se utiliza para remover el aire ocluido en emulsiones agua en aceite como mayonesa, para prevenir el desarrollo de la rancidez; estabiliza a las vitaminas que se encuentran en fase acuosa como el ácido ascórbico y a la cianocobalamina (B_{12}); determina glucosa en sistema cerrado por medida residual de oxígeno polarográficamente; y prolonga la vida de anaquel de semen de toro. (25)

La enzima *GOD* se utiliza también para eliminar la glucosa residual de los huevos y la clara batida previniendo así las reacciones de oscurecimiento de Maillard, en el desarrollo de sabores y olores desagradables y en el mejoramiento de sus propiedades de horneado. (3,14,24)

Evita el oscurecimiento en el procesamiento de la carne y papas deshidratadas(15). También se le ha empleado en la reducción de glucosa en licores de maíz. (25)

La vida útil de los alimentos de origen marino puede prolongarse con la mezcla enzimática de *GOD* y catalasa, por la formación del ácido glucónico hace descender el pH inhibiendo el crecimiento microbiano sin afectar las propiedades organolépticas. (25,37)

La producción de ácido glucónico y sales, para la obtención

de sales de alta pureza. En la maduración de la harina porque regularmente se le aplica agentes oxidantes para su maduración, pero se ha visto que la aplicación de GOD y catalasa, trae la producción de peróxido de hidrógeno y remoción de oxígeno que ayudan a las propiedades de horneado de la harina.

En el diagnóstico clínico se utiliza para determinar glucosa en fluidos corporales tales como sangre y orina. (37)

La alta especificidad de la enzima GOD es la base para el mejoramiento de la prueba de tolerancia de galactosa, en la evaluación de la función hepática es posible distinguir entre glucosa y galactosa en sangre. En sistemas cerrados, para el seguimiento del curso de reacciones glucogénicas de algunas enzimas: maltasa, invertasa, lactasa, fosfatasa, y β -glucosidasa.

La enzima se ha inmovilizado para estabilizarla y obtener un mejor aprovechamiento de sus propiedades (6,25) y recientemente se emplea en electrodos para la determinación de glucosa. Para la obtención de ácido glucónico altamente puro se ha utilizado sola o en combinación con otras enzimas a partir de maltosa empleando GOD y glucoamilasa. En la transformación de lignocelulosa se ha usado un sistema de enzima celulasa, GOD y peroxidasa.

1.3 CARACTERISTICAS DE LA PRODUCCION DE LA ENZIMA GOD A PARTIR DE Aspergillus niger.

La enzima GOD se obtiene como un subproducto en la producción

de ácido glucónico o de sus sales gluconato de calcio y gluconato de sodio a partir de A. niger.(14)

En 1904 Maximow extrae una oxidasa con acetona, a partir de A. niger (25). Posteriormente, Müller en 1928 aisló de las células del micelio de A. niger un extracto rico de la enzima (26, 30) de allí que *GOD* se considere una enzima intracelular localizada en el micelio del A. niger. En 1968 Zetelaki y Vas investigaron sobre la producción de la enzima en un fermentador de 5 Lt(41) y en 1970 en un fermentador de 400 l(42). La máxima actividad se reportó a las 48 horas con un medio que contenía sales, sacarosa y licor de maíz.

En 1972 Lakshminarayanan reportó una actividad de 6000 unidades Sarett empleando 22 g/l de glucosa, agua de cocimiento de maíz y nitrato de amonio con la cepa de A. niger NRRL 3, buscó la manera de suministrar cantidades bajas de sustrato en contraste con los medios utilizados anteriormente para la producción de *GOD*, que contenían 200g/l de glucosa cantidad similarmente utilizada a la producción de ácido glucónico .(14, 25)

Se ha encontrado que cuando se utilizan los nitratos como fuente de nitrógeno con la cepa A. niger para obtener una buena actividad de la enzima *GOD* resultan mejor en comparación con las sales de amonio.(26)

También para la producción de *GOD* se ha visto que las melazas son la fuente más recurrida por los investigadores, esto tal vez se deba a que es la más viable económicamente al ser un desecho a nivel industrial. (1, 25)

Por otro lado al emplear almidón y glicerol hay un crecimiento abundante de A. niger, pero no se obtiene una buena actividad de la enzima. (26)

1.4 METODOS DE EXTRACCION ENZIMAS INTRACELULARES

Los métodos utilizados por la Enzimología para la extracción de enzimas, depende de la ubicación de estas, dentro del microorganismo ó si es un metabolito que es excretado al medio. La recuperación de enzimas intracelulares es más difícil, porque las células microbianas tienen que ser rotas. Dentro de los métodos más utilizados cuando las enzimas son intracelulares estan los siguientes:

-Métodos Mecánicos:

homogenizadores , molinos, homenizador con perlas de vidrio prensa francesa, presión osmótica, sonicado, agitación a altas velocidades. (38, 22)

-Métodos químicos:

Lisis con sustancias tales como: tolueno, tricloroacético. (38)

Lisis enzimática: aspersasa. (1)

-Métodos físicos:

Congelación descongelación. (7)

1.5 LOCALIZACION DE LA ENZIMA EN EL Aspergillus. niger.

Existen varias opiniones respecto a la ubicación de la enzima en el microorganismo, Van Dijken y Veerhius 1980 han

demostrado cuando no se cultiva en un sistema continuo, la enzima está localizada en los peroxisomas que son organelos subcelulares que se describen como microcuerpos de 0.2-0.6 μ m y rodeados de una membrana de 70 Å de grosor, por otro lado Mischak 1985 ha encontrado que la enzima está distribuida tanto en el periplasma y el citoplasma (17).

Esta localización fue comprobada por Müller 1986, Mischak 1985 y Wittevee 1992 concluyeron que está adherida a la pared celular. (17, 40) Además Mishak demostró que al haber deficiencia de manganeso en el medio la enzima se libera al medio de cultivo. (17)

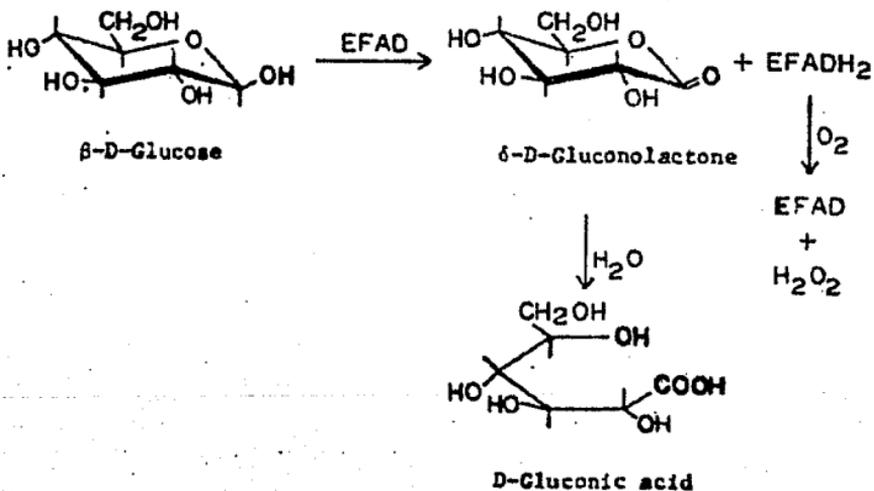
1.6 CARACTERISTICAS DE LA ENZIMA GOD .

La enzima GOD [β - D glucosa oxidoreductasa (EC. 1.1.3.4)] cataliza la oxidación de D-glucosa a D-glucolactona en presencia de oxígeno molecular. (11, 21, 24, 28) (En la página siguiente se muestra la reacción.) Se le ha clasificado a la GOD como una flavoproteína constituida por 2 subunidades de 80 000 daltones unidas por un enlace covalente de FAD (Flavin adenin dinucleótido). Además, se menciona que el FAD desempeña un papel importante en la acción catalítica de la enzima. (4, 21)

Dentro de las características de la enzima GOD de diversos orígenes se ha encontrado que posee las mismas propiedades. (4) (ver cuadro No 2)

El peso molecular de esta proteína es muy variado (150,000 hasta 180,000 daltones) dependiendo del método de

REACCION QUE CATALIZA LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA



determinación. (26, 31)

Tsugeh, et al en 1973 encontraron que tiene un 16% de carbohidratos, 74% de proteína, 2.4% de aminoazúcares y 2 moles de Fe por molécula. (32)

Se ha reportado que el contenido de residuos de carbohidratos de la GOD está integrado como una unidad estructural de la molécula de la enzima. La gran cantidad de carbohidratos da estabilidad a la molécula, necesitando altas concentraciones de sales para precipitar, presentando alta solubilidad en agua. (4) Y es la responsable de la resistencia de la proteína al 1 % SDS (4, 28)

La enzima GOD además de tener acción sobre D-glucosa actúa también sobre D-manosa, D-galactosa y D-xilosa.

De la estructura de la enzima GOD se ha informado que tiene residuos de carbohidratos como unidades estructurales de la molécula de la enzima de los que se han identificado D-galactosa y D-glucosamina y esta última se encuentra en su forma N-acetil cuando la enzima esta en su estado nativo. (21) Cuando la enzima se desnaturaliza suele presentar grupos sulfidrilos y disulfuros y más bien no se les logra titular cuando la enzima se encuentra en forma nativa. (4)

El pH óptimo de la actividad de la enzima es 5.5 y el punto isoeléctrico es 4.2. (21, 25)

-La enzima se puede inhibir por cobre y agentes quelantes. (25)

-Al estar compitiendo por arabinosa no se inhibe por HCN ó bióxido de carbono. (25)

-Esta enzima cataliza reacciones de segundo orden.

Los factores que inducen la producción de la enzima GOD son la alta concentración de glucosa los altos niveles en oxígeno y un pH cercano al pH 5. (26)

-La enzima es marcadamente resistente a las proteasas.(26)

Una de las cosas que más confunden es la multiplicidad de formas de determinación de la enzima GOD y unidades.

Las unidades y procedimientos estan divididos en manométricos y espectrofotométricos.

El método manométrico se basan en la medida de velocidad de desaparición del oxígeno. Debido a la reacción que se tiene, la enzima para tomar la glucosa toma oxígeno y hay la producción de peróxido de hidrógeno en ausencia de catalasa, por lo que es necesario definir si la unidad fue determinada en ausencia o presencia de catalasa. (25)

Las unidades comerciales usadas en los Estados Unidos y en todo el mundo son definidas como la cantidad de enzima la cual puede tomar 10 mm³ de oxígeno por minuto bajo las siguientes condiciones de determinación: pH 5.9, glucosa al 3%, dehydroacetato de sodio 0.4%, exceso de catalasa, y una exceso de aire a 30 C. (25)

El método titrimétrico de Underkofler utiliza el manómetro de Warburg a 30°. La actividad está definida como unidades Sarrette lo que equivale a 10 mm³ por minuto en presencia de un exceso de oxígeno en un buffer pH 5.9 conteniendo 3.3 % de glucosa. Estas unidades son 9/10 más grandes que las unidades internacionales y son aproximadamente iguales a 450 unidades

de Kusai. La unidad japonesa esta basada en la toma de un μ l de oxígeno por minuto. (26)

El test de GOD utiliza el método colorimétrico en el cual con la reacción que cataliza la enzima de oxidación de la glucosa a ácido glucónico con la producción de peróxido de hidrógeno, este último es el que se detecta colorimétricamente al reaccionar con peroxidasa y una sustancia cromógena como la o-dianisidina. (1, 20, 30, 34)

1.7 DESCRIPCION DEL Aspergillus niger.

Los hongos del género Aspergillus pertenecen a la clase de los Ascomycetes, se caracterizan por formar esporas sexuales llamadas ascosporas que son endógenas, están encerradas en un asca. (27)

El micelio basal compacto es blanco a amarillo y pronto da origen a estructuras conidiales abundantes, las cuales son negras. Al principio, las cabezas conidiales son grandes, negras globulosas, haciéndose radiadas o rompiéndose para formar cilindros sueltos. Hay olor mohoso característico producido por el hongo. (27)

Los conidióforos miden de 1.5 a 3.0 mm por 15 a 20 μ m, son lisos e incoloros, se oscurecen cerca de la vesícula.

La vesícula es globosa mide alrededor de 60 μ m de diámetro y origina fiálides en toda la superficie. Las fiálides están en dos series (biseriadas). Las primarias son largas (30 μ m ó más por 6 μ m) pudiendo estar tabicadas. Las secundarias son cortas 8 μ m por 3 μ m y brotan conidios. Estos son globosos de

4 a 5 μ m de diámetro de color castaño a negro rugosos.

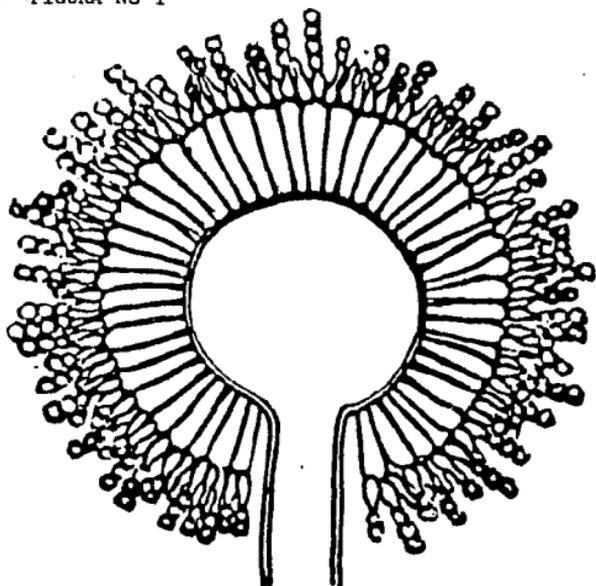
Esta especie crece en un rango óptimo de temperatura de 28 a 30 C, humedad del 95% y un pH entre 4.5 a 6.5 (27) (ver figura 1)

El hongo Aspergillus niger en los alimentos se presenta en pan, en frutas y hortalizas, conociéndose como podredumbre negra. (10)

Se ha empleado el hongo A. niger en la producción de infinidad de ácidos orgánicos, precursores de esteroides y enzimas (ver cuadro 1). Desde 1951 el complejo enzima GOD se produce a nivel industrial y comercial. Se considera que la producción mundial de GOD proviene en gran parte de A. niger. (25, 26).

En el caso de las preparaciones de GOD en Estados Unidos son derivadas de Aspergillus niger y son producidas por un número muy limitado de laboratorios. Por otro lado la producción de GOD en el Japón procede principalmente de Penicillium amasakiense y en pequeña proporción la de A. niger. (26) En contraste en América Latina la situación diferente, pues no se tiene una sola compañía que produzca dicha enzima. En nuestro país la totalidad de GOD que es empleada a nivel nacional es de importación (1, 20). Por lo que en el presente trabajo se trata de implementar una tecnología propia para la producción de GOD.

FIGURA No 1



Esquema de Aspergillus niger corte transversal.

Fuente: Rippon. W; Tratado de Micología Médica;
3a edición; Editorial Mc Graw Hill; México.

CUADRO No 1

ENZIMAS Y METABOLITOS PRODUCIDOS POR *A. niger* (22, 28)

ENZIMAS	<u>OXIDOREDUCTASAS:</u> glucosa oxidasa ,catalasa <u>HIDROLASAS:</u> α -amilasa bacteriana, α -amilasa fungal glucoamilasa celulosa compleja conteniendo endo β 1-4 glucanasa celobiohidrolasa β -glucanasa glucosidasa glucamilasa hemicelulasa α -galactosidasa lactasa lipasa naringinasa proteasa fungal pectinasa fungal pectinasa fungal conteniendo polimetilgalacturonaliasa y poligalacturonataliasa
OTROS	<u>CONVERTIDORES DE ESTEROIDES:</u> hidroxilación en 6,7,9,11,15 <u>ACIDOS:</u> Cítrico, glucónico

CUADRO No 2
 PROPIEDADES DE LA ENZIMA GOD, PROVENIENTE DE DIFERENTES
 HONGOS (25)

Procedencia de la enzima	Peso molecular (daltons)
<u>P. amagasakiense</u>	154,000
<u>P. notatum</u>	138,000 - 152,000
<u>A. niger</u>	150,000 - 180,000
	pH de Actividad de la enzima
<u>P. amagasakiense</u>	pH 3.5- 6.5
<u>A. niger</u>	pH 4.5- 5.5
	Constante de Michaelis (km)
<u>P. amagasakiense</u>	1.15×10^{-2} M
<u>P. notatum</u>	0.96×10^{-2} M
<u>A. niger</u>	.030 M

2.0.- **Objetivo General:** Seleccionar la metodología para la obtención del extracto crudo de la enzima glucosa oxidasa y evaluar la cepa nativa de A. niger como productora de esta enzima.

Objetivos Específicos:

- 2.1.- Determinar el método de liberación de la enzima glucosa oxidasa a partir del micelio de A. niger.
- 2.2.- Determinación de la actividad enzimática de *GOD* en diferentes condiciones de pH y fuente de carbono en el medio de cultivo obtenida de la cepa de A. niger.

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 CEPA EMPLEADA:

El microorganismo utilizado fue la cepa silvestre del hongo Aspergillus niger (A. niger) la cual fue donada por el laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Ciudad Universitaria. Para conservar la cepa y evitar resiembras frecuentes a lo largo del trabajo, se prepararon desde el inicio un total de 12 tubos con tapón de rosca conteniendo medio inclinado de agar papa dextrosa. El medio se esterilizó a 15 lb 15 minutos y después se pusieron los tubos a prueba de esterilidad en una estufa bacteriológica a 35 C. Después se sembraron cada uno de los tubos con el A. niger por la técnica conocida como estriado con una asa micológica y se incubaron a 25 C para su crecimiento y esporulación, una vez crecidos se sellaron los tubos con papel parafilm para evitar que el gel se desecara y se conservaron en refrigeración a 5 C durante toda la experimentación.

3.2 CULTIVO DE A niger.

Para el cultivo del microorganismo se tomó un tubo de los que fueron mantenidos bajo refrigeración conteniendo la cepa de A niger. Con el objeto de suspender las células crecidas en la superficie del agar en el tubo inclinado (se preparó una solución salina 0.85% de NaCl y 1% de tween 80), de dicha solución se tomó 5 ml y se adicionó al tubo conteniendo el hongo en condiciones estériles. La suspensión celular de 5

ml se adicionó al medio de inóculo en condiciones estériles. La preparación del inóculo se hizo, manteniendolo en agitación constante en un agitador orbital a 100 rpm para fomentar el crecimiento celular, a las 24 horas de incubación a temperatura ambiente este matraz se inoculó al medio A (glucosa- miel de maíz) en condiciones de esterilidad.

3.3 OBTENCION DEL EXTRACTO CELULAR

Debido a que la enzima *GOD* es intracelular, se emplearon diferentes métodos de rompimiento para obtenerla.

El crecimiento del hongo *A. niger* se separó del medio de cultivo A pasándolo a través de papel filtro whatman # 52 empleando un embudo buchner y para evitar dejar residuos del medio de cultivo en el micelio se hicieron varios lavados con agua destilada.

El micelio tratado de la forma anterior se sometió a los métodos disponibles de rompimiento, por tiempos variables segun el método empleado. El tiempo total en cada método fue determinado a través de la observación de la destrucción total del micelio al microscopio óptico, como se describe a continuación.

3.3.1 ROMPIMIENTO QUIMICO

3.3.1.1 LISIS CON TOLUENO

A una muestra de 20 g de micelio húmedo se le adicionó tolueno al 100%, después de un período de dos semanas al autolizado se le eliminó el tolueno agregandole un volumen

similar de buffer pH 7, se dejó reposar 5 horas y se decantó el sobrenadante y se le observó al microscopio con la tinción de azul de algodón.

3.3.2 ROMPIMIENTO MECANICO (22,38)

3.3.2.1 TUBO TEMBRUCK

La biomasa del A. niger se sometió a una temperatura de refrigeración de 5 C y se tomó una muestra de 0.1g que se colocó en el tubo tembruck con un volumen similar de buffer pH 7, se le colocó un baño de hielo alrededor del tubo tembruck; durante el procesamiento de la muestra se hicieron movimientos de pistón de arriba hacia abajo, hasta lograr el rompimiento del micelio; posteriormente la solución obtenida se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos a 5 grados centígrados, se decantó y el sobrenadante se observó al microscopio con la tinción azul de algodón para confirmar el rompimiento celular.

3.3.2.2 TIPO PRENSA FRANCESA (figura No 3)

El micelio ya filtrado y lavado se congeló dentro de un compartimento de la prensa con buffer pH 7. Una vez congelado el micelio, se armó todo el dispositivo de la prensa, se ejerció una presión hasta que se pudo romper el micelio, el proceso concluyó cuando se obtuvo un líquido que se alojó en la parte inferior de la prensa y que se sustrajo por medio de una llave de drenado; el desecho de micelio quedó retenido por medio de una malla. El líquido obtenido se observó al

microscopio con la tinción de azul de algodón.

3.3.2.3 HOMOGENIZADOR CON PERLAS DE VIDRIO

Una muestra de 20 g del micelio proveniente de la filtración y lavado, se puso a congelar con buffer pH 7 y se colocó dentro del homogenizador con perlas de vidrio por medio del cual se obtuvo un extracto celular y trazas de vidrio. Para la eliminación del vidrio se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos a 5 C , se tomó el sobrenadante, el cual fue observado al microscopio con una tinción azul de algodón.

3.3.3 ROMPIMIENTO FISICO

3.3.3.1 CONGELACION Y DESCONGELACION

Del micelio A. niger ya filtrado y lavado, se tomaron 20 g que se congeló rápidamente con buffer pH 7 a una temperatura de -18 C en un ultracongelador biofreezer durante 4 horas, después se descongeló en baño María a 90 C. El proceso se repitió cuantas veces fue necesario hasta tener el rompimiento de las células. Por decantación se separaron los restos celulares y el sobrenadante.

Al sobrenadante que se obtuvo en el caso anterior se le observó al microscopio con una tinción de azul de algodón, para poder determinar el grado de rompimiento del micelio. De los métodos anteriores el que dió mayor eficiencia con respecto a rompimiento del micelio de A. niger se seleccionó como mejor método para aplicarlo dentro de la siguiente etapa.

3.4 MEDIOS DE CULTIVO

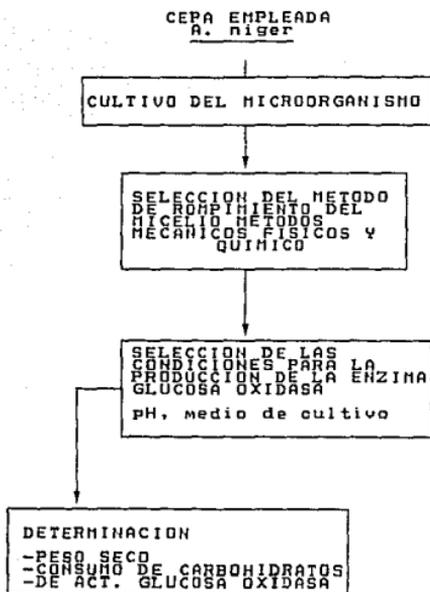
Como en el medio de Zetelaki(29, 34, 35) se ha reportado que hay producción de la enzima GOD, se hizo la siguiente modificación del medio, en sus siguientes componentes sacarosa y licor de maíz, que sustituyo respectivamente por glucosa y miel de maíz (cuadro No 4).

CUADRO No 3 MEDIO DE INOCULO
DENOMINADO YPG (1)

	g/l
Extracto de levadura	3
Peptona de caseína	1
Glucosa	10

FIGURA No2

METODOLOGIA



CUADRO No 4

MEDIO DE ZETELAKI Y LOS MEDIOS MODIFICADOS DE ZETELAKI

MEDIO DE ZETELAKI	MEDIOS DE ZETELAKI MODIFICADOS		
	COMPONENTES %	MEDIO A %	MEDIO B %
Glucosa 5.0	5.0	5.0	-
Ca(NO ₃) ₂ H ₂ O 0.2	0.2	0.2	0.2
Acido cítrico 0.7	0.7	0.7	0.7
K ₂ HPO ₄ 0.025	0.025	0.025	0.025
KCl 0.025	0.025	0.025	0.025
MgSO ₄ 7H ₂ O 0.025	0.025	0.025	0.025
FeCl ₃ 6H ₂ O 0.001	0.001	0.001	0.001
Licor de maíz 2.0	miel de maíz= 2.0	-	miel de maíz= 2.0

INFLUENCIA DEL pH EN LA PRODUCCION DE GOD
Se cultivo la cepa de A. niger por un tiempo de 48 horas en el Medio A (glucosa-miel de maíz) a los siguientes pH's 4,5,6,7,8 y se le midió cualitativamente la actividad enzimática del micelio, se seleccionaron aquellos pH's que presentaron actividad.

3.5 EFECTO DE LA VARIACION DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA PRODUCCION DE LA ENZIMA GOD, PESO SECO Y CONSUMO DE CARBOHIDRATOS A PARTIR DE LA CEPA SILVESTRE DE A. niger.

La cepa de A niger se puso a crecer en cada uno de los medios A (glucosa-miel de maíz), B (glucosa), C (miel de maíz) durante 27 horas a temperatura ambiente para realizar las curvas de crecimiento en los diferentes medios de cultivo propuestos.

Los medios A(glucosa-miel de maíz) ó B(glucosa) ó C(miel de maíz) se colocaron en un fermentador rustico con una capacidad de 3 Litros ver fig (4) que quedo constituido de la siguiente manera una bomba de acuario que proveía la agitación al sistema con una capacidad de 10 galones americanos, el control del aire que ingresaba al fermentador era esteril por medio de un filtro, con tubo de respiración ó línea de venteo y con un tubo para la toma de muestra. Durante la curva de crecimiento se tomaron muestras de 50 ml cada 6 hrs conteniendo medio de cultivo y biomasa la muestra se trato de obtener lo más homogeneamente posible. Todas las muestras recolectadas se obtuvieron en condiciones de

esterilidad y se distribuyeron de la siguiente forma:

20 ml se destinaron para determinación del peso seco, 10 ml para la prueba del consumo de carbohidratos y 20 ml para la cuantificación de actividad enzimática. Todas las muestras se colocaron en refrigeración a 4 C. Para la determinación de carbohidratos en el medio de cultivo fue importante separar la biomasa del medio de cultivo lo más rápidamente posible. Para peso seco y la actividad enzimática fue importante separar la biomasa del medio de cultivo lo más rápidamente

3.5.1 METODOS ANALITICOS

3.5.1.2 DETERMINACION DEL PESO SECO:

Se determinó a través de las muestras de 20 ml de filtrado, que se pusieron dentro de un papel filtro que previamente se mantuvo a peso constante (se pesó el papel filtro y se eliminó toda la humedad que contenía el papel dentro de una estufa a una temperatura de 100 C por un período de 6 hrs y después se colocó dentro de un desecador y se volvió a pesar hasta que el papel filtro no varió su peso).

Después de la filtración del micelio, el papel filtro se puso en la estufa a una temperatura de 100 C por un período de 6 hrs y después se pesó y se colocó nuevamente dentro del desecador y se volvió a pesar hasta que el peso no varió y se hicieran los calculos correspondiente para obtener el peso seco.

3.5.1.2 DETERMINACION DE CONSUMO DE CARBOHIDRATOS

Se determinó a través de la técnica de Nelson-Somogyi ver apéndice 1.

3.5.1.3 DETERMINACION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GOD

Se determinó por la técnica utilizada por Aldama. ver apéndice 1.

FIGURA No 3 PRENSA TIPO FRANCESA

34

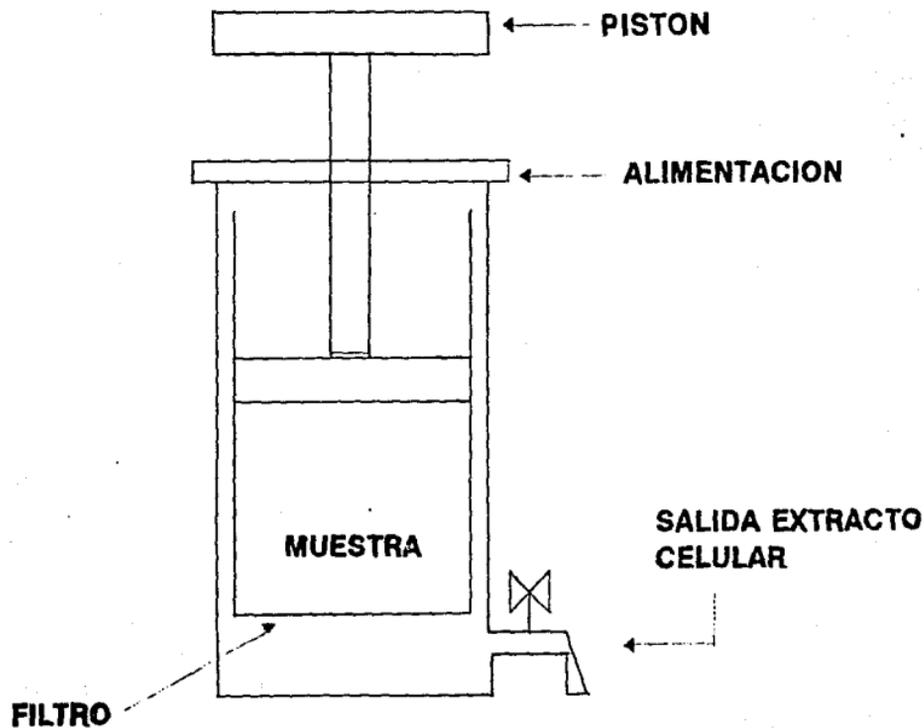
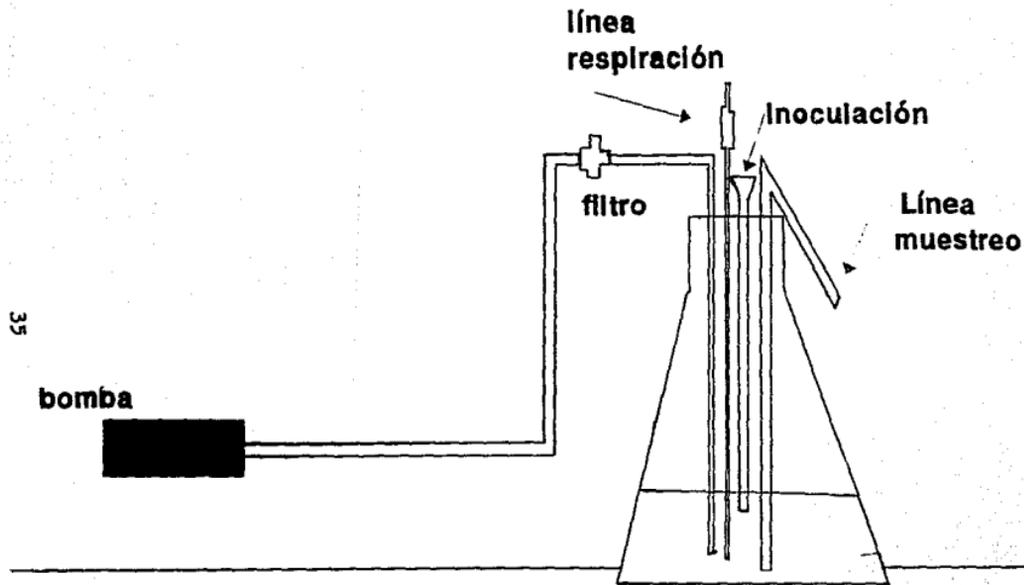


FIGURA No 4 FERMENTADOR



4 RESULTADOS

Para ensayar los diferentes tipos de rompimiento del micelio de A. niger con el propósito de obtener extracto celular se cultivo en el medio A (glucosa- miel de maíz), obteniéndose mejores resultados con los métodos mecánicos como se puede observar en el cuadro 5, siendo el tubo tembruck el más eficiente en cuanto a tiempo de trabajo siguiendole en importancia el homogenizador con perlas de vidrio.

En base al criterio anterior se seleccionó el tubo tembruck, para rompimiento del micelio de A. niger. y así poder realizar las variantes de pH y fuente de carbono en el medio de cultivo de A. niger, con el fin de obtener una mejor producción de la enzima glucosa oxidasa.

Al variar el pH se observó que solo a pH 6 y 7 se presentó actividad de la enzima a pesar de haber también crecimiento en los demás pH's. (Ver cuadro 6)

Una vez que se establecieron las mejores condiciones de pH(6 y 7), se tomaron en cuenta al realizar las formulaciones de los medios de cultivo de A. niger. Al cultivar el hongo los medios de cultivo A (glucosa-miel de maíz), B(glucosa) y C(miel de maíz) como las diferentes fuentes de carbono, el crecimiento de A. niger. se desarrolló en forma de esferas con un diámetro promedio de 5-6 mm al termino del cultivo. Con el fin de ver el efecto de la fuente de carbono se determino el crecimiento del microorganismo (peso seco y consumo de carbohidratos) y su relación con la producción de la enzima (actividad específica y actividad volumétrica).

La influencia de los diferentes medios empleados para la obtención de peso seco se muestra en la gráfica 1, el medio A (glucosa -miel de maíz) pH 6 a las 27 horas tuvo un peso seco de 4.58 g/l y al variar el pH a 7 para el mismo medio A se ve mejor comportamiento (6.830 g/l) al comparar con las demás variantes ya que con el medio B (glucosa) pH 6 se obtuvo un peso seco máximo las 25 horas con 6.46 g/L y con el medio C(miel de maíz) pH 6 se tiene que a las 23 horas presenta un valor máximo de peso seco de 2.205g/l.

Las determinaciones de actividad específica de la enzima se hicieron por el método colorimétrico, previamente el micelio se rompió con el tubo tembruck.

El perfil de crecimiento de la cepa de A. niger en el medio A (glucosa-miel de maíz) pH 6 , a las 31 horas el peso seco se obtuvo como máximo de 6.600 g/l, mientras que a las 16 horas la actividad específica se observa como un máximo de 364 U/g, presentando un decremento en la actividad.(gráfica 2)

Con el medio A(glucosa-miel de maíz) pH 7 se observa que a las 27 horas se tuvo un peso seco máximo de 6.830 g/L y a las 25 horas se presenta una actividad de 337 U/g mostrándose como valor máximo para este medio.(gráfica 3)

El comportamiento de la cepa de A. niger en el medio B(glucosa) pH 6 a las 25 horas con un máximo en el peso seco de 6.465g /L y con una actividad de 190.5 U/l como valor máximo a las 18 horas se muestra en la gráfica 4.

El medio C (miel de maíz) pH 6 a las 23 horas, tuvo un máximo

en el peso seco de 2.205 g y una actividad específica de 267.5 U/g a las 27 horas de crecimiento. (ver gráfica 5)

El medio que presentó la mejor la actividad específica de la enzima fue el medio A (glucosa miel de maíz) con 364.52 U/L a las 16 horas de crecimiento. (Ver gráfica 6 y 10)

Para evaluar la enzima en su actividad ya sea específica y volumétrica, es necesario tomar en cuenta que la actividad específica se obtuvo como una determinación en el micelio que se estableció como U/g de micelio, mientras que la obtención de la actividad volumétrica se ve influida por la actividad específica y el peso seco como se pueden observar en los cuadros 7, 8, 9 y 10.

Con el medio A (glucosa-miel de maíz) pH 6 a las 16 horas se muestra la actividad específica más alta, mientras que la actividad volumétrica máxima se obtuvo a las 27 horas con un valor de 860 U/l. (cuadro 7)

Para el medio B (glucosa) pH 6 muestra a las 18 horas una actividad específica alta y la actividad volumétrica se registra a las 27 horas con un valor de 1186.33 U /l. (cuadro 8)

Con el medio C pH 6 la actividad específica más alta se tuvo a las 27 horas y el de volumétrica se ve a las 23 horas con 522.59 U/L. (cuadro 9)

En el medio A (glucosa-miel de maíz) pH 7 y la mejor actividad específica coincidió con el valor más alto de la actividad volumétrica siendo de 2046 U/l a las 25 horas siendo el único caso que coinciden estos valores. (cuadro 10)

El maximo consumo de carbohidratos por A. niger en el medio A se obtuvo a partir de las 13 horas y manteniendose constante hasta las 26 horas (gráfica 7)

Para el medio B(glucosa) el consumo se obtuvo a las 16 horas permaneciendo constante hasta las a las 23 horas.(gráfica 8)

En el medio C(miel de maíz) el consumo de carbohidrato a las 13 horas hay un consumo mayor del sustrato pero en lo que duro el cultivo se mantiene constante la asimilación del carbohidrato hasta las 35 horas. (gráfica 9)

CUADRO No 5 DIFERENTES METODOS DE ROMPIMIENTO DEL MICELIO DE *A. niger*. Y TIEMPO DE PROCESO.

METODO	OBSERVACION	TIEMPO ROMPIMIENTO	TIEMPO TOTAL PROCESO
	DESTRUCCION TOTAL DEL MICELIO	MINUTOS	MINUTOS
LISIS			
TOLUENO	-	20160	24480
TUBO			
TEMBRUCK	+	2	10
PRENSA			
	-	30	270
HOMOGENIZADOR			
CON PERLAS	+	15	30
CONG.			
DESCON.	-	4320	4320

CUADRO No 6 PRODUCCION DE GOD A DIFERENTES pH's A PARTIR DE CEPA SILVESTRE DE Aspergillus niger

TEMPERATURA AMBIENTAL MEDIO A (GLUCOSA-MIEL DE MAIZ)		
pH	ACTIVIDAD CUALITATIVA	CRECIMIENTO IN VITRO DEL HONGO
4	-	+
5	-	+
6	+	+
7	+	+
8	-	+

CUADRO No 7 ACTIVIDAD ESPECIFICA Y ACTIVIDAD VOLUMETRICA DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA A PARTIR DE LA CEPA SILVESTRE *Aspergillus niger*. Medio A(glucosa-miel de maíz) pH 6

TIEMPO HORAS	PESO SECO g/l	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/g	ACTIVIDAD VOLUMETRICA U/l
8	0.575	78.0	44.85
16	1.680	364.52	612.36
25	2.375	240.60	571.43
27	4.580	187.91	860.50

CUADRO No 8 ACTIVIDAD ESPECIFICA Y ACTIVIDAD VOLUMETRICA DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA A PARTIR DE LA CEPA SILVESTRE A. niger. Medio B(glucosa) pH 6

TIEMPO HORAS	PESO SECO g/l	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/g	ACTIVIDAD VOLUMETRICA U/l
16	0.780	147.4	114.97
18	1.490	190.50	283.85
23	5.350	162.60	869.91
27	6.465	183.50	1186.33

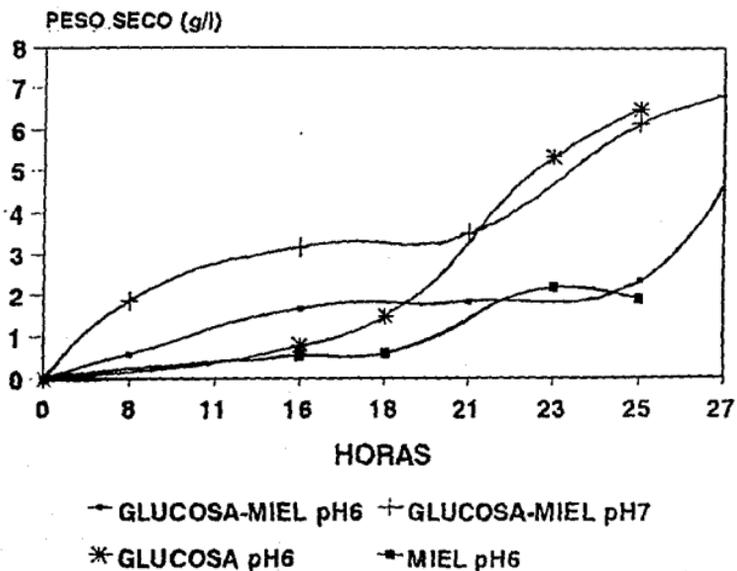
CUADRO No 9 ACTIVIDAD ESPECIFICA Y ACTIVIDAD VOLUMETRICA DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA A PARTIR DE LA CEPA SILVESTRE *A. niger*. Medio C(miel de maíz) pH 6

TIEMPO HORAS	PESO SECO g/l	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/g	ACTIVIDAD VOLUMETRICA U/l
16	0.545	198.30	108.07
18	0.595	198.30	117.90
23	2.205	237.00	522.59
27	1.920	260.30	499.78

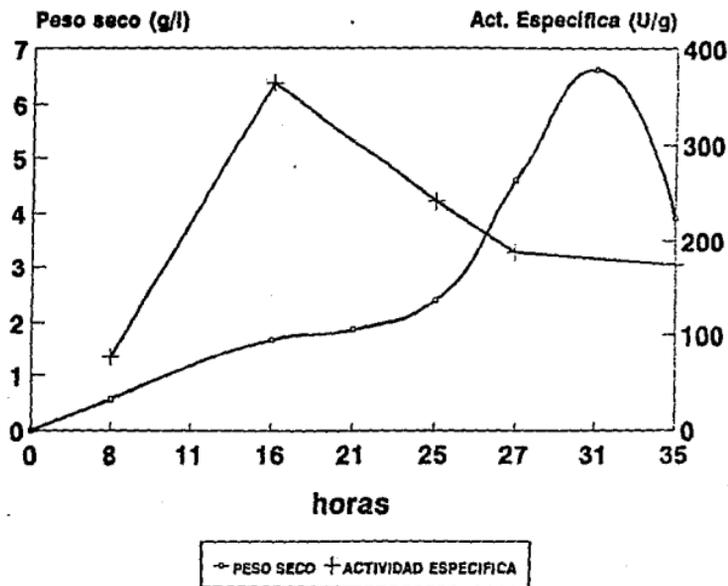
CUADRO No 10 ACTIVIDAD ESPECIFICA Y ACTIVIDAD VOLUMETRICA DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA A PARTIR DE LA CEPA SILVESTRE *A. niger*. Medio A (glucosa-miel de maíz) pH 7

TIEMPO HORAS	PESO SECO g/l	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/g	ACTIVIDAD VOLUMETRICA U/l
8	1.860	52.5	97.65
16	3.185	143.2	456.09
25	6.115	334.7	2046.0
27	6.830	213.7	1459.57

GRAFICA 1
 INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO EN DIFERENTES MEDIOS
 EN LA OBTENCION DEL PESO DE *A. niger*

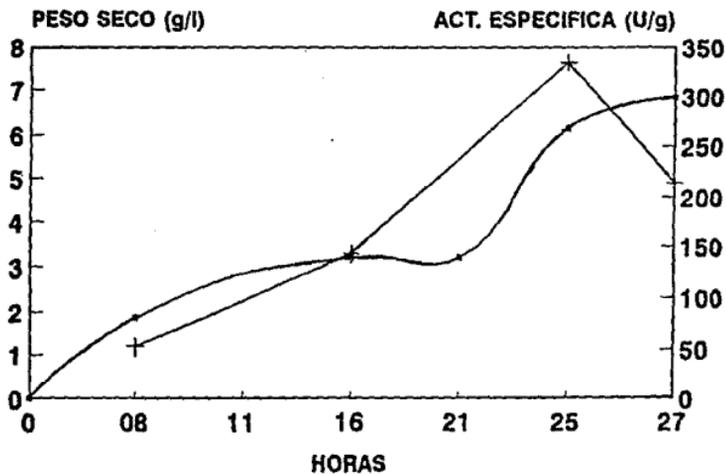


GRAFICA 2
RELACION DEL PESO SECO Y ACTIVIDAD(GOD) EN EL MEDIO A(GLUCOSA-MIEL DE MAIZ)pH 6
DURANTE EL CRECIMIENTO DE *A. niger*.



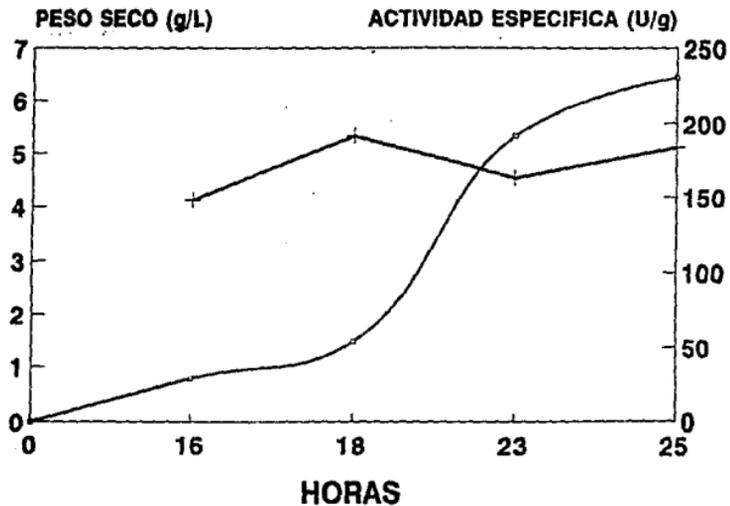
47

GRAFICA 3
RELACION DEL PESO SECO Y ACTIVIDAD (GOD) EN EL MEDIO A(GLUCOSA-MIEL
DE MAIZ) pH7
DURANTE EL CRECIMIENTO DE *A. niger*.



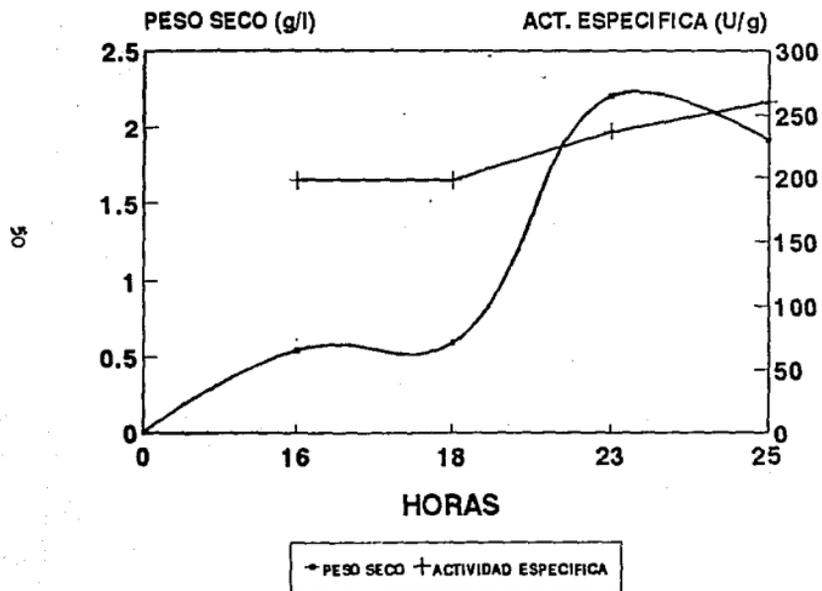
◆ PESO SECO + ACTIVIDAD ESPECIFICA

GRAFICA 4
RELACION DEL PESO SECO Y ACTIVIDAD (GOD) EN EL MEDIO B(GLUCOSA) pH6
DURANTE EL CRECIMIENTO DE *A. niger*.

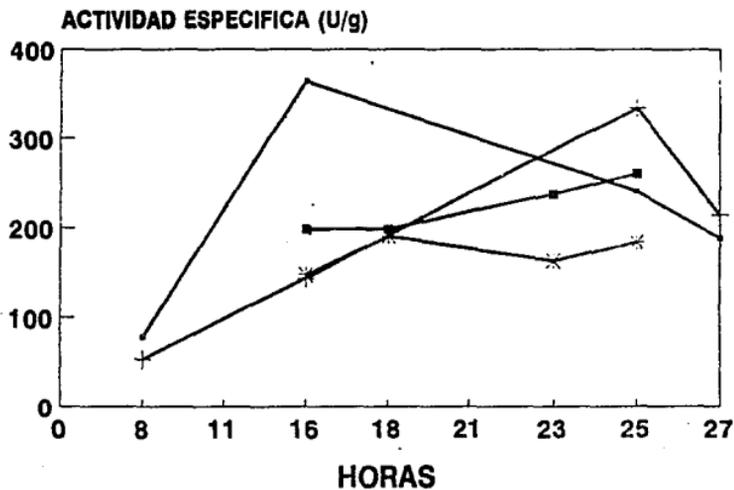


□ PESO SECO + ACTIVIDAD ENZIMATICA

GRAFICA 5
RELACION DEL PESO SECO Y ACTIVIDAD(GOD) EN EL MEDIO C(MIEL DE MAIZ) pH6
DURANTE EL CRECIMIENTO DE *A. niger*.



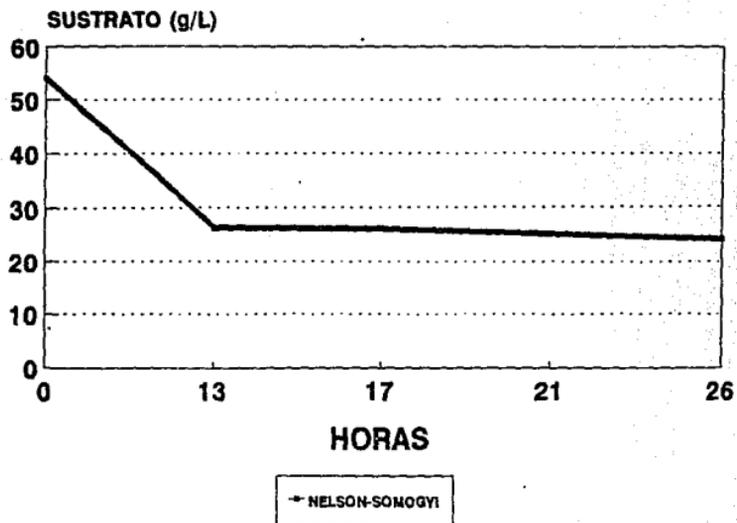
GRAFICA 6
COMPORTAMIENTO DE ACTIVIDAD (GOD) DE *A. niger* EN DIFERENTES MEDIOS



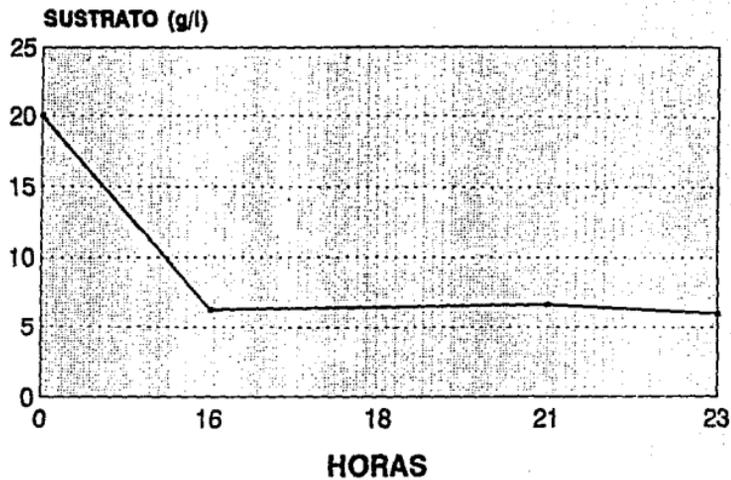
→ GLUCOSA-MIEL pH6 + GLUCOSA-MIEL pH7

* GLUCOSA pH6 ■ MIEL pH6

GRAFICA 7
CONSUMO DE CARBOHIDRATOS EN EL MEDIO
A(GLUCOSA-MIEL DE MAIZ) pH6
DE *A. niger*.

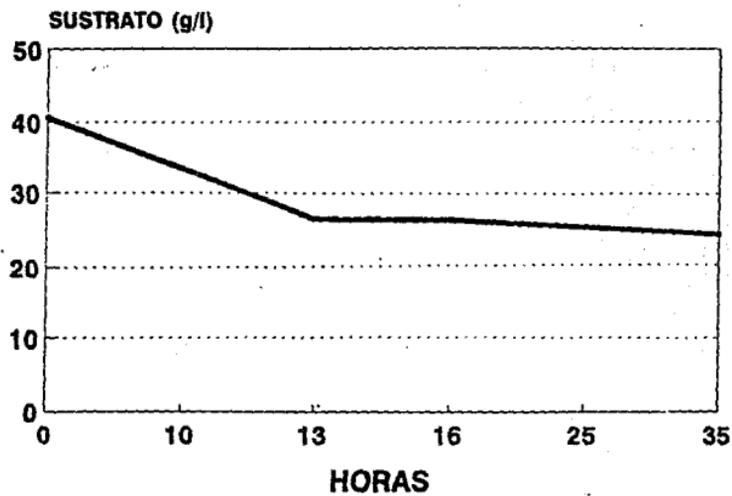


GRAFICA 8
CONSUMO DE CARBOHIDRATOS EN EL MEDIO B(GLUCOSA) pH 6
DE *A. niger*.



→ NELSON-SOMOGY

GRAFICA 9
CONSUMO DE CARBOHIDRATOS EN EL MEDIO C (MIEL DE MAIZ) pH:6
DE *A. niger*.

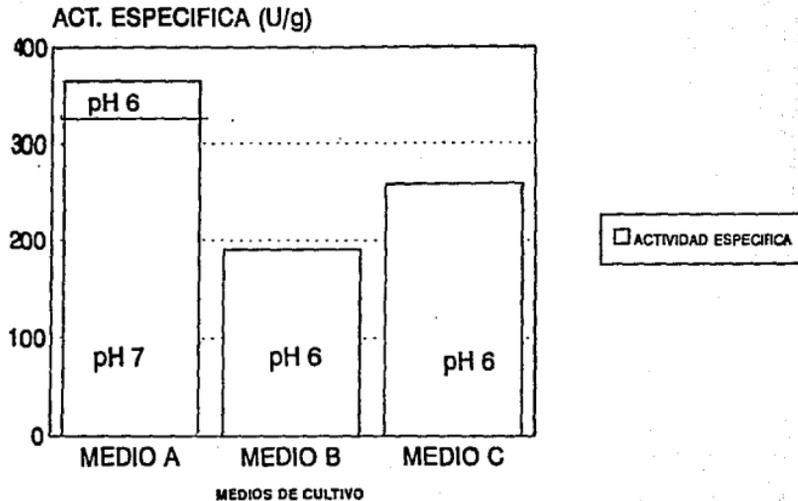


→ NELSON-SOMOGY

GRAFICA 10

ACTIVIDAD GOD DE *A. niger*. EN DIFERENTES MEDIOS.

55



5 DISCUSION

La enzima glucosa oxidasa como ya se mencionó, es intracelular por lo que fue necesario probar diferentes métodos de rompimiento; la estructura de la pared celular de los hongos difiere notablemente de las bacterias, por lo que se necesitan métodos más drásticos (38). Gómez (1988) empleó para el rompimiento de la pared celular del A. niger el Vibrador Braun, no menciona tiempo de trabajo, pero indica que es muy rápido, recomendó en segundo lugar al sonicado.(9) Aldama(1990) utilizó la enzima *aspersasa* en un periodo de 24 horas siendo muy eficiente, obteniendo resultados similares al emplear la maceración del micelio con polvo de vidrio con una duración de 15 minutos.(1) Voget et al(1988) menciona la utilización de la prensa (Biox Sweden) con la que realizó el rompimiento del micelio, no indicando tiempo.(35)

En contraste con los métodos empleados en este trabajo se utilizaron los siguientes métodos para ensayar los diferentes tipos de rompimiento como son: homogenizador con perlas de vidrio, prensa, lisis con tolueno, congelación y descongelación y tubo tembruck. Se eligió el método que dió menor tiempo además, se tomó en cuenta la temperatura de trabajo y se trató de evitar la pérdida de la enzima en específico con el tubo tembruck se logró un menor tiempo de rompimiento que no supero los 10 minutos; si se manejan mayores tiempos es recomendable bajar la temperatura de 4 C, porque si no se procede de tal manera se podría desnaturalizar a la enzima.

Con el medio glucosa-miel maíz, pH 7 gráfica 3, que es el que se propuso para trabajar con esta cepa se obtiene un mayor crecimiento del hongo donde al suministrar glucosa el microorganismo empieza su desarrollo rápidamente y poco a poco continua desdoblando la miel de maíz, aparentemente hay acción de la enzima ya que la actividad específica es alta de 213 U/g. Si se compara con el medio C miel de maíz pH 6 gráfica 5 se observa un menor crecimiento pero una actividad ligeramente mayor al anterior. Esto podría explicarse porque posiblemente la acción de la enzima sea detectable en pH's más ácidos ya que el medio inicial tenía pH 6 pero a las 27 horas, debió ser más ácido que con el medio anterior.

Voget et al(1988) observó la influencia de la fuente de carbono, para la actividad de la enzima, con sacarosa, glucosa, lactosa, maltosa, almidón, realizando curvas de crecimiento en los pH's 3-2 y obtuvieron actividades de glucosa oxidasa en un rango de 15- 122 U/g.(35) También se ha reportado que los pH ideales para trabajar son los siguientes pH's 5-6.6, pero manteniendo el pH constante(28). Por otro lado el presente estudio no se realizó bajo las condiciones que se mencionaron anteriormente. En el presente estudio se manejó la cepa silvestre de A. niger a los pH's 6 y 7 siendo superiores a los que marca la literatura, pero se obtuvo buena producción de la enzima como se puede observar en las gráficas 2 y 3 probablemente por iniciar en el medio de cultivo en pH's menos ácidos .

En las gráficas 2 (pH6) y 3(pH7) con el medio propuesto

(glucosa- miel de maíz) se muestran buenas condiciones para la producción de la enzima glucosa oxidasa, pero la selección condiciones se eligió del mejor pH fue a través de los siguientes factores el tiempo de producción que fuera a temprana hora y que la actividad específica se obtuviera como máxima. Por lo anterior las otras fuentes de carbono se trabajaron con pH 6.

Voget et al 1988 reportó el crecimiento celular de 8.6 g/L en el medio B(glucosa) con una actividad de 86 U/g.(35)

Aldama (1990) con nitrato de potasio, minerales, agua de cocimiento 150 U/ g con crecimiento celular con 5 g/l. En contraste con este trabajo, con el medio A (glucosa-miel de maíz) 1.680 g/l se obtuvo una actividad específica de 364.52 U/g.(1) Lo anterior se puede explicar con lo que mencionó Malanowska J (1976) que indica que el estimular la el desarrollo celular conduce a reducir los niveles de actividad enzimática de la glucosa oxidasa,(16) lo que confirma que el medio glucosa -miel de maíz sigue siendo un buen medio para la producción de actividad enzimática.

En las gráficas 2,3,4,5 todos los perfiles de producción la enzima se muestra que tienden al decremento esto se puede atribuir como lo menciona Zetelaki (41, 42) a que el oxígeno disuelto en el medio pudiera ser una limitante y no se cree que sea debido al agotamiento de la fuente de carbono ya que en los 2 medios (glucosa -miel de maíz) y (miel de maíz) probados se observa que hay residuos de glucosa con un promedio de 27 g/l, que aparentemente el microorganismo no

consumió a las 27 horas de incubación; aún en el medio que lleva solo glucosa se obtiene un residuo de 7 g/l; posiblemente si se pudiera controlar la aereación estos residuos pudieran disminuir.

El medio propuesto (glucosa -miel de maíz) con composición mineral del medio de Zetelaki resultó mejor como se observo en la gráfica 10 tal vez sea debido a sus altas concentraciones de carbohidratos, como lo reportó la literatura el tener una concentración de sustrato alta es bueno porque de esta manera se esta induciendo la actividad de la enzima(25) o también lo atribuimos a la cepa con que se trabajó.

Los trabajos que se han mencionado implican la utilización de cepas de colección *A. niger* NRRL3 Voget(35), Aldama *A. niger* BA-25(1).

En cuanto a la actividad volumétrica no tiene relación con la actividad específica ya que se puede tener poco crecimiento y una actividad específica alta, puesto que la actividad volumétrica se saca en base a peso seco. Se vió que con el medio A pH 6, en donde a las 16 horas se obtiene una actividad específica de 364.52 U/g, que es la mejor obtenida en este estudio en contraste con los demás medios se mostró baja la actividad volumétrica. Por lo que no es confiable tomar en cuenta este dato en forma aislada.

Pero a pesar de eso los datos de actividad volumétrica aportados en este trabajo son obtenidos como buenos comparados con los otros investigadores como Voget (1990) con

un valor (374-740) U/l (35); Gómez (1988) con un valor de 992 U/l con A. niger BA-25 en comparación con la cepa silvestre de A. niger 2046 U/l.

6 CONCLUSIONES

- 1.-La cepa silvestre de Aspergillus niger es una buena productora de la enzima glucosa oxidasa.
- 2.-De los métodos de rompimiento utilizados el tubo Tembruck con un tiempo de 2 minutos fue el mejor.
- 3.-Las cantidades de sustrato que se utilizaron fueron reducidas comparadas con el que se reporta en la literatura.
- 4.-El medio propuesto, con fuente de carbono glucosa-miel de maíz con la misma composición del medio mineral al de Zetelaki, para la producción de glucosa oxidasa, resultó mejor en cuanto actividades específicas y actividades volumétricas.

APENDICE 1

TECNICA DE NELSON SOMOGYI (19)

Se determina al hacer reaccionar un azúcar reductor como glucosa se forma óxido cuproso de color rojo. La base es la donación de electrones del agente reductor al oxidante ion Cu^{++} que se transforma en ion Cu^{+} .

Se prepara un patrón de glucosa de 200 mg/ml, después se hace una curva estandar en la cual se relaciona la concentración de glucosa con la absorbancia que se lee en el espectrofotómetro.

Se toma un ml de muestra problema, se le adiciona 1 ml de reactivo de cobre.

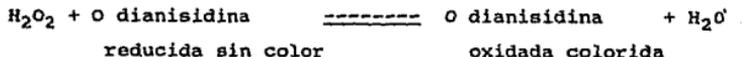
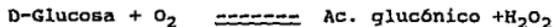
Al tubo problema se le cola una canica, se pone en un baño maría hirviente durante 1 minuto y posteriormente se adiciona el reactivo de Arsenomolibdato 1.5 ml y posteriormente se le adiciona 7.5 ml de agua destilada y mezcla por agitación en el vortrex y por último se lee al espectrofotómetro a 620 nm y se obtiene el dato de absorbancia.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE GLUCOSA OXIDASA

Fundamento de actividad de Glucosa oxidasa (1, 30)

La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico con la producción de peróxido de hidrógeno, el cual se determina colorimétricamente al reaccionar con peroxidasa y una sustancia cromógena como la o -dianisidina.

La actividad de la GOD se determina por la incorporación de peroxidasa y un cromógeno como la orto-dianisidina en la mezcla de reacción la peroxidasa POD utiliza el H_2O_2 producido por la reacción enzimática y oxida el cromógeno transformándose en un compuesto colorido el cual se mide espectrofotométricamente.



Reactivos(17).-

- A. Solución de peroxidasa [10 mg peroxidasa (Sigma P-B250) en 1000 ml de regulador de fosfatos pH 7.].
- B. Solución de o-dianisidina (Aldrich 10,259-8) (300mg en 50 ml de agua destilada.

C. 20 ml A + 1 ml B (preparado al momento de usarse).

D. Solución de glucosa al 18%.

E. Acido clorhídrico 6 N.

Procedimiento

Se toma 2 ml de la muestra problema se le adiciona 2 ml del reactivo C, a intervalos de tiempos iguales y 2 ml del reactivo D. La reacción se deja transcurrir a temperatura ambiente por un período de 5 a 10 min (dependiendo de la actividad enzimática). Se preparará un testigo a una concentración de una de 100mU/ml de glucosa oxidasa (SIGMA G-6641) similarmente tratada. La reacción se detiene con la adición de 2.5 ml del reactivo. El color desarrollado al termino de la reacción se lee a 540 nm en un espectrofotómetro, empleando como blanco agua tratada de la misma forma.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Aldama, S.A. 1990. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de glucosa oxidasa de A. niger. Tesis E.N.C.B
- 2.-Alexopoulos, C.J. 1976. Introducción a la Micología. Ed Universitaria. 2a edición. Buenos Aires.
- 3.-Baker, S.A. and Shirley, J.A. 1980. Glucose oxidase in microbial enzymes and Bioconversion. Vol 5. Ed. Rose. A.H. Academic Press. New York pp 173-182.
- 4.-Bennett, E., Swoboda, P. and Massey V. 1965. Purification and properties of glucosa oxidase from Aspergillus niger. The Journal of biological chemistry, 240 (5):2209
- 5.-Bonifaz, A. 1990. Micología Médica Básica. Ed. Francisco Méndez Cervantes. México.
- 6.-Brown, C.M., Campbell, I. and Priest F.G. 1989. Introducción a la biotecnología. Ed Acribia. España.
- 7.-Cambell, I. and Duffus, J.H. 1988. Yeast, A practical approach IRL Press Oxford Washington D.C pp 163-173.
- 8.-García, T.R. y Córdoba, P.R. 1988. Manual Ilustrado de Técnicas de laboratorio utilizados en Bacteriología y Micología Veterinaria. ISBN México.
- 9.-Gómez, S.L. 1988. Selección de una cepa de A. niger y condiciones de fermentación para la producción de glucosa oxidasa. Tesis E.N.C.B.
- 10.-Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. 1978. Microbiología de los Alimentos. 3 edición. Ed Acribia España. pp 89-90
- 11.-James, J., Malley, O. and Weaver, J.L. 1972. Subunit Structure of glucose oxidase from Aspergillus niger. Biochemistry. 11(19):3527
- 12.-Kelley, R.L. and Adinarayana, R. 1986. Purification and characterization of glucose oxidase from lignolytic Cultures Phanerochaete chrysosporium, Journal of Bacteriology. 166 (1):269
- 13.-Kim, K.K., Fravel, R.D. and Papavizas, C.G. 1988. Identification of a Metabolite produced by Talaromyces flavus as Glucose Oxidase and its role in the biocontrol of Verticillium Dahliae. Phytopathology 78 :488
- 14.-Lashminarayanan, K. 1972. Method for the production of glucose oxidase. Patente No. 3,701,715, USA.

- 15.-Low, N., Jiang, B., Ooraikul, S., Dokhani. and Palcic M.M. 1989. Reduction of glucose oxidase .Journal of food Science 54(1) 118-121.
- 16.-Malanowska, J. 1972. Studies on the production of glucose oxidase preparations.Prace .Inst.Lab.Bad.Orzem.Spoz 26:275-320
- 17.-Mischak, H., Kubicek, C.P and Röhr, M. 1985. Formation and location of glucose oxidase in airtic acid producingh mycelia of A niger. Appl. Microbiol.Biotechnol 21:27-31
- 18.-Nakamatsu, T., Akamatsu, T., Miyajima, R. and Shho, I. 1975. Microbial production of glucose oxidase Agr. Biol.Chem 39 (9) 1803
- 19.-Norton, N. 1944A. Photometric adaption of Somogyi method for determination of glucose. J.Biolo.Chem. 153:375-380
- 20.-Orto, P.M.C.1989. Purificación y caracterización de glucosa oxidasa de A niger.Tesis E.N.C.B.
- 21.-Pazur, J.H. 1966. Glucose oxidase from Aspergillus niger. In:Wood W.A Methods in Enzimology.Academic Press Vol 9 N.Y pp 82-86
- 22.-Peppler, H.J. and Perlman, D. 1979. Microbial Technology, Microbial Processes. Academic Press. USA. pp 293-297
- 23.-Presscott, D. 1982. Industrial microbiology. 4th Edition. edited by General Reed AVI PCINC. Wesport ,Connecticut.
- 24.-Quentin, G.,Bennet.E.,Swoboda, P. and Massey, V. 1964 Kinetics and Mechanism of action of glucose oxidase, The Journal of Biological Chemistry,239 (11):3927
- 25.-Reed, G. 1975. Enzymes in food processing. Second Edition. Academic Press. New York.
- 26.-Renhm, J.H., Reed. G., Kennedy, J.F.,BIOTECHNOLOGY. 1987. Enzime technology.Vol 7a .pp109-110.
- 27.-Rippon, J.W. 1974. Tratado de Micología Médica. 3a edición. Editorial Interamericana. Ed Mc Graw Hill, México.
- 28.-Röhr, M., Kubicek, C.P., and Kominek, J. 1983. Ac. Gluconic in Biotechnology.,eds Rehm,H.J y G Reed.Ed Verlag Chemie Weinhlm .pp 455-465

- 29.-Sanner, C., Macheroux, P., Rüterjans, H., Müller, F. and Bacher. 1991 A.N-and C-NMR investigations of glucose oxidase from Aspergillus niger. Eur.J.Biochem. 196:663-672
- 30.-Sigma Chemical Company.Instructivo de especificaciones para la glucosa oxidasa de A niger Tipo V
- 31.-Smith, J. and Berry, R.D.1975. The filamentous Fungi Halsted Press. New York USA. Vol 1 y 2
- 32.-Tsugeh, O. and Ohasshi, K. 1975. Purification, Properties and molecular features of glucose oxidase from Aspergillus niger J.Biochem 78 (6):835
- 33.-Van Dijken, J.P. and Veenhuis, M. 1980. Cytochemical localization of glucose oxidase of A. niger. Eur. J. Appl Microbiol. Biotechnol. 9:275-283.
- 34.-Voget, C.E., Mazza, L.A and Balatti.A.P. 1988. Determinación colorimétrica de glucosa oxidasa en preparados enzimáticos y extractos celulares. Rev.Lat-amer.Microbiol 30 pp47-52
- 35.-Voget, C.E., Mazza, L.A and Balatti, A.P. 1988. Producción de glucosa oxidasa con Aspergillus niger NRRL3. Rev.Lat-amer Microbiol 30pp53-58
- 36.-Underkofter, L.A and Hichey, R.J. 1959. Industrial Fermentations ,Publishing Co ,Inc N.Y. pp 446-454
- 37.-Wiseman, A.1991. Manual de Biotecnología de los enzimas. Editorial Acribia, España.
- 38.-Whitaker, J.R. 1972. Principles of enzymology for the Food Sciences. New York pp 561-570.
- 39.-Witteveen, F.B., Van de Vondervoort, P., Swart, K. and Visser, J.1990. Glucose oxidase overproducing and negative mutans of A. niger Appl. Microbiol.Biotechnol 33:683-686
- 40.-Witteveen, F.B., Veenhuis, M. and Visser, J. 1992. Location of glucose oxidase and catalasa activities in A niger. Applied and Environment Microbiology 58(4) :1190-1194
- 41.-Zetelaki, K and Vas, K. 1968. The role of aeration and agitation in production of glucose oxidase in submerged culture. Biotechnology and bioengineering 10:45-59.

42.-Zetelaki, K.Z. 1970. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de glucosa oxidase in submerged culture II. Biotecnology and Bioengineering 12:379-397.