

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela de Biología



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"PURIFICACION DE GLUCOSA OXIDASA"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

HEIDI LETICIA ROMERO SCHMIDT

GUADALAJARA, JAL.

1987



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

	PAGINA
ABSTRACT	1
CAPITULO I	2
Introducción	
CAPITULO II	7
Antecedentes	
CAPITULO III	18
Justificación	
CAPITULO IV	23
Materiales / Métodos	
CAPITULO V	47
Resultados	
CAPITULO VI	58
Discusión	
CAPITULO VII	63
Conclusión	
CAPITULO VIII	65
Referencias	
CAPITULO IX	66
Bibliografía	
APENDICE	72

A B S T R A C T

Glucose oxidase (E.C. 1.1.3.4) is one of the enzymes which have more uses than any one, as: in clinic Chemistry, in the quantification of glucose in body fluids, in the food industry, in production of gluconic acid, as stabilizer of emulsions of citric beverages and in the pharmaceutical industry in the elaboration of test tapes. These are some examples.

Besides, the glucose oxidase is one of the few enzymes which has all the characteristics to be produced industrially, such as:

- It has an extensive application
- It is obtained from a microorganism which allows an absolute control over the raw material from which it is obtained, and
- It is internationally accepted.

The commercial glucose oxidase actually is obtained, in other countries, mainly from Aspergillus niger but it is also obtained from other microorganisms, for example: in various Penicillium species.

In this work, the method established for the production, extraction and purification of this enzyme was from Aspergillus niger.

CAPITULO I INTRODUCCION.

México es un país que tradicionalmente ha dependido de la importación de productos o de tecnología (Azcunna, 1953). Es por lo tanto de suma importancia desarrollar o adaptar técnicas que permitan resolver problemas nacionales, en las áreas de la Salud, los alimentos y otras industrias de importancia social y económica (Miranda, J.A., 1981).

Para reducir importaciones es necesario ampliar las posibilidades de independizarse por medio de la investigación tecnológica científica y lograr transferir tecnología a los sectores productivos (Colla, C., 1984).

En las áreas mencionadas se requiere del reactivo para análisis, patrones de referencia y enzimas, que en el presente tienen que importarse. Este hecho tiene las siguientes desventajas:

- a) Altos costos
- b) Trámites de importación
- c) No siempre las casas comerciales cuentan con el almacén necesario para surtir a corto plazo.

De lo anterior se deduce la necesidad de generar e impulsar nuevos conocimientos en el campo de la Biotecnología, dentro de ella la Tecnología Enzimática (Miranda, J.A., 1981).

Las enzimas son catalizadores de origen bioquímico y se caracterizan por poseer una extraordinaria especificidad y reactividad (alto número de reemplazo) en sistemas biológicos.

Las enzimas se encuentran en todos los organismos vivos, donde sirven para catalizar y regular una multitud de reacciones químicas esenciales para mantener la existencia del organismo.

En los documentos recitales a principios del siglo XIX estas sustancias de origen biológico fueron llamadas "fermentos" (Gutcho, D.J., 1974). La papaína del estómago del ternero, la diastasa de la cebada fueron los primeros "fermentos" o enzimas extraídas de sus fuentes naturales e identificadas en términos de un compuesto capaz de transformar una sustancia en otra (Pelczar, H.J., 1970).

En 1835 se publicó la primer teoría general sobre la catálisis química por J. J. Berzelius (García, H.F., 1983).

En 1840, Pasteur demostró el papel de las células de levadura en la fermentación del azúcar. Más tarde en 1857 Buchner descubre que los "fermentos" de las células vivas, permanecen activos en los jugos que pueden ser extraídos de éstas. Un

extracto de células de levadura era capaz de fermentar azúcar en alcohol (Paloczai, M.J., 1972).

Por el comienzo del siglo XX, muchas enzimas habían sido encontradas y fueron reconocidas como sustancias relacionadas con organismos vivos (García, R.F., 1982).

En 1926, la ureasa fue la primer enzima cristalizada en un estudio hecho por I. B. Sumner a partir de extractos de la alubia *Cannavalia ensiformis* ((L.) DC (McVaugh, R., 1984)). Poco tiempo después en 1930 y a casi diez años de su descubrimiento la pepsina fue aislada también en forma cristalina por Northrop (Gutcho, G.J., 1974).

La cristalización de las enzimas fue una guía para su identificación como proteínas. Investigaciones posteriores de la Bioquímica de organismos, demostraron el papel de las enzimas y la Enzimología llegó a ser una ciencia actual.

Un desarrollo importante durante esos años fue el reconocimiento de las aplicaciones comerciales y ventajas de las enzimas. La producción de enzimas llegó a ser importante y nuevas y abundantes fuentes biológicas fueron sugeridas para ello.

En un principio, todas las enzimas de uso industrial tenían un origen vegetal o animal, recientemente técnicas especializadas fueron desarrolladas para el aislamiento de microorganismos y para el aislamiento de enzimas específicas procesadas por estos microorganismos.

El logro de procesos que utilizan básicamente sistemas microbianos en la producción de enzimas y otros productos, es una posibilidad atractiva, en virtud de que dichos sistemas poseen características muy favorables entre las que destacan una tasa de crecimiento muy superior a la de otros microorganismos, lo que redundo en una mayor productividad.

Además su propagación es independiente de las condiciones climáticas y su manejo es poco complicado (Riviers, J., 1973).

Por otro lado las necesidades de los microorganismos por lo que respecta a la nutrición son fáciles de satisfacer gracias a su capacidad para sintetizar, a partir de nutrientes sencillos, los factores esenciales para su crecimiento.

Esto hace que subproductos agrícolas como lo son el licor de caña, la escarilla de arroz, el bagazo de caña de azúcar, puedan ser utilizados como fuente de carbono y nitrógeno en el medio nutritivo, por lo que los costos de obtención de la enzima son reducidos (Fradec, A., 1967).

Así, grandes poblaciones de células microbianas pueden ser producidas dentro de un tiempo relativamente corto. Una masa homogénea de células obtenidas bajo condiciones controladas, es un excelente material crudo para la producción de enzimas. Este material es factible de ser congelado y almacenado para ser utilizado meses y aún años después, evitando así la dependencia de materia prima de algún proveedor.

Las enzimas microbianas son actualmente utilizadas en un gran número de industrias; quesos, panes y bebidas alcohólicas y otros alimentos fermentados son producidos por enzimas de microorganismos intactos (Reinert,3.T.,1963).

A las enzimas aisladas de microorganismos también se les ha encontrado un amplio rango de aplicaciones adicionales, como son: en la industria farmacéutica, en detergentes, en aditivos para alimentos, como reactivos de diagnóstico, para la producción de químicos y en el tratamiento de desechos industriales (Reed,3.,1969).

Los esfuerzos de Microbiólogos, Encimólogos, Bioquímicos, Biólogos e Ingenieros son necesarios para la producción económica y la eficiente aplicación de las enzimas microbianas.

El objetivo principal de este trabajo es el de desarrollar una tecnología para la producción, extracción, purificación / cuantificación de la glucosa-oxidasa, enzima importante tanto clínica como industrialmente, a partir del hongo filamentoso: Aspergillus niger (Thom,3.,1963).

Se pretende también dar mayor importancia a este tipo de recursos poco o no explotados actualmente en nuestro país, para en un futuro sustituir importaciones de productos como éste.

CAPITULO II

ANTECEDENTES.

Desde su descubrimiento en Aspergillus niger por Muller en 1929 (Fogarty, M.W., 1935) la glucosa-oxalasa (CO) (E.C.1.1.3.4.) D-D-glucosa, oxígeno-1-oxígeno-reductasa) (Parman, T.E., 1955), ha sido reportada también por Franke en 1944 (Rose, A.H., 1950) en Penicillium glaucum (Link, H.F., 1824) según Pitt, J., (1979) ; por Kellin y Hartree en 1943 en P. notatum (Westling, R., 1911) Pitt, J., (1979) ; por Kusai, K. en 1960 en P. amagasakiense (Kusai, et al., 1958) Pitt, J., (1979) y por Bean y Hassid (Rose, A.H. 1950) en 1956 en un alga roja Irigoienia flaccida (KVLIN, H., 1940) según Rose, A.H. (1950)

Estas y otras fuentes, incluyendo algunos frutos cítricos, miel y las glándulas faríngeas de la abeja, fueron comparadas y revisadas por Schepartz y Subers, (1964). Generalmente se había asumido que la CO de fuentes diferentes tenía las mismas propiedades. Swoboda y Massey (1964) compararon las propiedades físicas y químicas de la enzima purificada a partir de A. niger, con los datos publicados para la CO de otras fuentes fungales y demostraron que la enzima producida por P. notatum y P. amagasakiense son diferentes de la de A. niger. (Tabla 2.1).

La CO de origen fúngal se encuentra comercialmente disponible de varias compañías, siendo la más comúnmente usada la de A. niger, debido a que ésta ha sido profundamente estudiada (Fogarty, M.W., 1935).

Tabla 2.1

FUENTE	<i>A.niger</i>	Miel	<i>P. amagasakiense</i>	<i>P. notatum</i>
P.M.	186000	<100000	154000	152000
pH Optimo	5.5	5.6-5.8	5.6 - 5.8	5.6-5.8
Q (U.I.)	80	---	112	64
Km Glucosa	0.11 M	1.5 M	---	9.6 mM
Km oxígeno	0.2 mM	---	---	---
p I	4.2-4.3	4.2-4.3	4.2 - 4.3	4.2-4.3
T Optima	30-35	30-35	30-35	30-35
pH Estable	4.5-7.0	---	---	---

ESTRUCTURA.

O'Malley y Weaver en 1972 (Gutano, D.J., 1974) demostraron que la GO de *Aspergillus niger*, es una glicoproteína que contiene 12 % de carbohidratos con manosa como azúcar dominante y dos cofactores Flavin-Adenín-Dinucleótido (FAD) por molécula (Fogarty, M.W., 1985 y Swoboda and Mausey, 1973).

Hayashi y Nakamura en 1981 (Fogarty, M.W., 1985) concuerdan en que la molécula contiene dos unidades de FAD (Scott, D., 1975), y además separaron de una muestra de enzima pura, seis componentes con puntos isoelectrónicos entre pH 3.7 y 4.3. La composición proteica fue idéntica (Tabla 2.2) y los seis componentes fueron inmunológicamente similares.

No existe diferencia significativa para los valores de Km o de número de recambio para la glucosa entre los componentes, pero sí existe en la parte de carbohidratos (Tabla 2.3) (Fogarty, M.W., 1985).

Nakamura, et al, en 1976 (Fogarty, M.W., 1985) estudiaron el papel de los carbohidratos en la GO de A. niger. Estos fueron marcadamente resistentes a la hidrólisis.

La reactividad inmunológica de la enzima no se ve afectada por la remoción de sus carbohidratos y además se concluyó que los carbohidratos nunca participan en la actividad catalítica ni ayudan a mantener la conformación de la molécula.

La naturaleza de las uniones carbohidrato-proteína se cree que son a través de enlaces amida directos entre la glucosamina y los aminoácidos carboxílicos (Fogarty, M.W., 1985).

La enzima nativa tiene un peso molecular de 160,000 (Crueger, W., 1984 y Maugh, T.H., 1984), pero reduciendo los dos puentes disulfuro de la misma, con β -mercaptoetanol, se obtiene una especie molecular de 80,100 (Reed, J., 1959 y Rose, A.H., 1960).

La GO tiene secuencia común de aminoácidos en el C-terminal, (ala-met-gli-cooh) pero la secuencia del N-terminal está enmascarada y no se ha podido determinar hasta la fecha (Fogarty, M.W., 1985).

Tabla 2.2

Composición de aminoácidos de la GO purificada de

Aspergillus niger.

Hayashi y Nakamura en 1981. (Fogarty, M.W., 1983)

residuos de aminoácidos/FAD.

Lisina (+)	38.9
Histidina(+)	31.3
Arginina(+)	47.5
Acido aspártico(+)	149.5
Treonina (n)	64.0
Serina (n)	76.5
Acido glutámico (+)	109.0
Prolina	57.9
Glicina	113.0
Alanina	134.2
Cisteína (n)	4.6
Valina	92.5
Metionina	26.0
Isoleucina	52.1
Leucina	103.0
Tirosina (n)	53.0
Fenilalanina	37.0
Triptófano	15.8

Tabla 2.3
 Contenido de carbohidratos y composición de los seis componentes
 aislados de la 30 de *B. dactyloides*
 Hayashi / Nakamura en 1981(Fuganry, H., 1983)

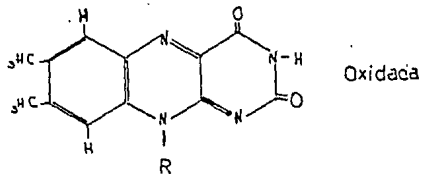
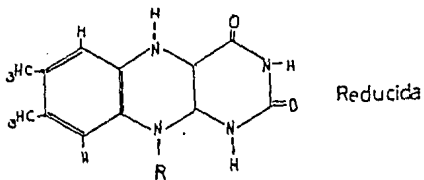
	I	II	III	IV	V	VI
Parte insoluble	3.86	4.68	4.17	4.25	4.29	4.33
% Carbohidratos	11.30	10.24	9.79	8.75	8.40	7.94
	Residuos / molécula					
	105.5	84.5	85.3	60.3	62.2	61.0
Mucosa	11.6	10.1	7.0	4.3	4.0	4.7
Galactosa	0.4	-	0.4	0.7	0.7	-
Glucosa	17.2	17.3	10.7	15.6	10.7	10.2

traces.

El nucleótido de flavina se encuentra unido a la proteína de tal manera que la forma reducida del mismo se halla disponible para que reaccione con el oxígeno. Las flavín-nucleósidos reducidos son reoxidados por el oxígeno para ser perdidos de nitrógeno (Laringer, A., 1981).

El FAD se disuelve de la GO a pH menores de 2.8 y en presencia de sulfato de amonio en una saturación del 50 % (Fawcett, J.W., 1963 y Scott, D., 1961).

La pérdida del FAD de la enzima de An. niger causa pérdida irreversible de la actividad, mientras que la enzima de Trichium no puede ser regenerada por adición de la coenzima (Foparty, M.W., 1961).

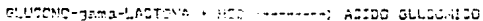
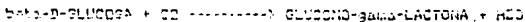


Molécula de FAD

MECANISMO DE REACCION.

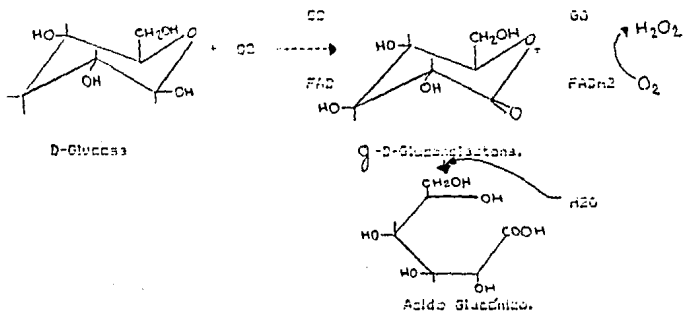
La GO es una deshidrogenasa aeróbica (Barman, T.E., 1965 y Winkler, M., 1966) que cataliza la oxidación de la D-D-glucosa a D-glucolactona como producto intermedio, que se hidroliza espontáneamente a ácido glucónico (Rose, A.H., 1960 y Shuboda and Mackerell, 1965).

GO



La enzima exhibe una actividad máxima a pH 5.6 y a temperatura de entre 37°, 40° C (Reed, S., 1967).

Dright y Gibson (Fogarty, M.W., 1966) sugieren que la reacción se lleva a cabo como sigue:



2 Ca H12 O6 + 2 H2O + 2 CO ----- 2 Ca H12 O7 + 2 H2O2

Las preparaciones comerciales frecuentemente vienen acompañadas de catalasa (Lehninger, A., 1978 y Reed, S., 1969). Su presentación es en polvo amaro, solución o en cristales (Lehninger, A., 1978 y Winkler, M., 1970).

PROPIEDADES E INHIBIDORES.

La enzima producida por A. niger es intracelular, permanece dentro del micelio durante el cultivo sumergido (Rose, A., 1960).

Tiene un pH óptimo de 5.5, pero exhibe actividad en un rango de entre 4.5 y 7 (Fogarty, M.W., 1965 y Reed, S., 1969). En un pH mayor no hay actividad debido a que la enzima se hace inestable y en un pH menor la velocidad de la reacción se hace muy lenta (Fogarty, M.W., 1965).

Presenta actividad a temperaturas de entre 30 o y 60 o C (Fogarty, M.W., 1965 y Reed, S., 1969), siendo la óptima de 37 o C (Rose, A., 1960). La CO se desnaturaliza a 72.3 o C y por debajo de los 30 o C es inactiva (Fogarty, M.W., 1965).

El punto de fusión máxima está entre 270-280, 375-380, 450-460 en solución acuosa y es de color amarillo debido a la presencia del grupo flavín (Windholz, M., 1953).

El punto isoelectrico es de 4.2-4.3. La GO en solución es estable seis meses a 4 °C, tres meses a 27 °C y once días a 30 °C (Fogarty, M.W., 1955). En polvo, si se mantiene bajo cero grados, puede conservar su actividad catal. por varios años.

El Km para la glucosa es de 0.003 (Rose, A.H., 1960) y la forma Beta de la glucosa se oxidada 150 veces más rápido que la forma Alfa (Fogarty, M.W., 1955). Hasta la alta especificidad para la D-glucosa otras hexosas, pentosas o disacáridos no son oxidados u sólo en cantidades insignificantes.

La oxidación de Ascorbato es fuertemente inhibida por Ag⁺, Hg⁺, Cu⁺ (Scott, D., 1970), pteridinas, sulbenzato y por acetato ferrimercúrico (Barnes, T.E., 1955 ; Helling, D., 1948). Los dos primeros iones metálicos inhiben la oxidación del FAD compitiendo con el oxígeno molecular que es el aceptor de hidrógenos (Rose, A.H., 1960).

También se demostró que una estructura análoga a la D-glucosa, llamada D-glucal (glucosato de Ca) (Windholz, M., 1953) es un inhibidor de la GO, esta inhibición es competitiva con respecto a la glucosa. Fue postulado que el D-glucal se une con el sitio activo de la GO, ya que en el espectro de absorción visible, el enlace de la enzima con el FAD es perturbado en presencia del D-glucal (Fogarty, M.W., 1955).

El cido también es un inhibidor competitivo con la D-glucosa. Rogers y Brandt en 1971 (Fugarty, M.W., 1959) presentaron evidencias de que tanto el D-glucal como el cido pueden unirse simultáneamente con la enzima (Reinhardt, G.F., 1963).

Otros inhibidores para la GO de *A. niger* son la D-arabinosa y la D-dehidro-D-glucosa (Berman, T.E., 1955).

DESCRIPCION DEL HONGO Aspergillus.

El género Aspergillus está ampliamente distribuido en la naturaleza y se encuentra en la superficie de frutas, vegetales, otros sustratos de los cuales puede proveerse de nutrientes. Algunas especies de este género frecuentemente contaminan alimentos, por ejemplo el pan (Moore, E.L., 1962).

Este género es importante económicamente debido a que algunas especies son utilizadas en fermentaciones industriales, como por ejemplo en la producción de amilasa por *A. niger* (Taniya, J., 1952) (Pitt, J., 1977), en la producción de ácido cítrico y glucónico, ambos producidos en abundancia por una cepa de *Aspergillus* (Palazar, M.J., 1970).

Morfológicamente Aspergillus es un hongo microscópico, con talo filamentosos (micelial) (UNCG, M., 1976). Aspergillus posee pared celular compuesta de glucani mananos (polímeros de manosa) y celulosa (Moore, E.L., 1962).

En lo que respecta a su reproducción, la sexual se desconoce (UNCG, M., 1976), en la asexual presenta conidióforos o hifas

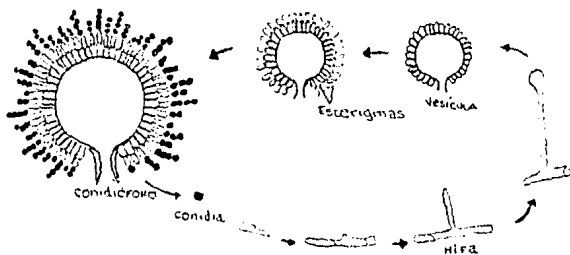
hifas que se originan de las células basales, las cuales pueden estar sumergidas en el medio nutritivo (Palczar, N.J., 1972). Los conidióforos en el ápice se ensanchan formando un vesícula globosa, ésta a su vez le origina a esterigmas en forma radiada que, pueden ser de capa simple (primaria o múltiple) o de capa doble (primaria y secundaria o múltiple y filiales). Los conidióforos son secos, es decir sin mucilago (Nobre, E.L., 1962).

Las conidias o esporas se originan de los esterigmas y son sustentadas en cadenas (Núñez, N., 1976). Las hifas generalmente son filiformes o de colores claros, las conidias son de varios colores dependiendo de la especie; los colores comunes son negro, café y verde. A. niger produce conidias negras y sus septos (anersporas) (Nobre, E.L., 1962).

Aspergillus crece en altas concentraciones de azúcares y sales lo que indica que puede extraer el agua que requiere para su crecimiento de sustancias relativamente secas (alimentos secos como el pan y pastillas) (Nobre, E.L., 1962).

DESARROLLO DEL APARATO CONIDIAL EN A. niger

(Nobis, D., and Raper, N.B., 1943)



CAPITULO III
JUSTIFICACION.

APLICACIONES DE LA GLUCOSA-OXIDASA.

La enzima GO esta aceptada legalmente para ser empleada en la industria alimenticia en muchos países. En la mayoría de los casos es usada en pequeñas cantidades.

Las preparaciones comerciales de la GO para ser empleadas en alimentos están estandarizadas generalmente en 200 a 1,500 unidades/gm, si es en forma líquida o en 1,500 unidades/gm si es en polvo (Scott, D., 1975).

A pesar de que la enzima es sumamente específica, se le han encontrado numerosas aplicaciones. Evidentemente puede ser empleada en cuatro formas, para:

- Producción de peróxido de hidrógeno.
- Producción de ácido gluconico.
- Remoción de glucosa.
- Remoción de almidón.

PRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO

Cuantificación de glucosa (Scott, D., 1975).

Aceptada a una segunda enzima, como la peroxidasa, que utiliza el peróxido de hidrógeno generado por la GO, y a un cromógeno se utiliza en la cuantificación de glucosa tanto clínica como

Industrialmente y en la elaboración de tiras reactivas (Fogarty, M.M., 1965 , Gatcho, C.J., 1974 y Pelczar, M.J., 1972).

En pruebas de tolerancia a la galactosa (Scott, D., 1975).

La galactosa en pacientes normales en ayunas, se transforma rápidamente en glucosa-6-fosfato, la cual da lugar inmediatamente a glucosa sanguínea libre en presencia de una fosfoglucomutasa y la glucosa-6-fosfatasa.

Cuando existe deficiencia de glucosa-6-fosfatasa, la glucosa sanguínea casi no aumenta después de la inyección de galactosa (11 gr/kg). La glucosa se cuantifica con SO acoplada a peroxidasa (Lynch, M.J., 1972 / Staunton, A., 1970).

PRODUCCION DE ACIDO GLUCONICO Y SUS SALES.

Producción de ácido glucónico.

El ácido glucónico puede ser preparado por medios químico, uno de los cuales envuelve la oxidación de la glucosa con SO y también puede ser producido directamente por A. niger junto con ácido cítrico y oxálico (Pelczar, M.J., 1972).

El ácido glucónico se utiliza como aditivo en detergentes para lavavajillas automáticos, para evitar y eliminar manchas en superficies de vidrio durante la precipitación de sales de calcio y magnesio que contiene el agua (Atlas, M.R., 1934)

Sal de calcio.

El gluconato de calcio, es empleado como fuente de calcio para infantes y mujeres embarazadas (Atlas,M.R.,1984 , Pelczar,M.J.,1972 y Windholz ,M.,1980) y en la Medicina Veterinaria se utiliza en el tratamiento de ganado que presenta la enfermedad llamada "Fiebre de leche" (patología que se presenta frecuentemente por hipocalcemia después del parto y que puede causar la muerte (Martinez,M.A.,1984 y Windholz,M.,1980).

Sal de sodio.

El gluconato de sodio, se utiliza para evitar la precipitación de sales de calcio y magnesio en soluciones alcalinas (como emulsificante) y para evitar la formación de espuma en equipo automático de lavado (Pelczar,M.J.,1972 y Scott, D.,1975).

Sal de hierro.

El gluconato ferroso se usa farmacéuticamente para suplir deficiencias de hierro en el cuerpo en el tratamiento de anemia (Atlas,M.R.,1984).

REACCION DE GLUCOSA.

Para prevenir la reacción de Maillard.

La reacción de Maillard se presenta principalmente en alimentos procesados como son huevo en polvo, carne seca, papas

deshidratadas, fruta congelada, leche en polvo, etc (Durand, G., 1952 , Rusel, R., 1954 y Scott, D., 1975).

Esta reacción ocurre entre un grupo aldehído y un grupo amino. Los grupos aldehído encontrados en los alimentos usualmente están en forma de azúcares, principalmente glucosa; los grupos amino se encuentran en las proteínas (Reed, G., 1949 y Scott, D., 1975).

Cuando un material proteína-azúcar contiene glucosa, o algún otro azúcar reductor, presenta condiciones favorables para la reacción de Maillard en la que sucede una desaparición de glucosa y grupos amino libres y después de un pequeño lapso, una pérdida de solubilidad, cambio en el sabor y olor, y subsiguientemente el desarrollo de color café (Scott, D., 1975 y Taylor, R.J., 1930).

El método usual para evitar la reacción de Maillard es remover o hacer inactivo uno de los reactivos. El uso de un sistema GO-catalasa transforma la glucosa en ácido glucónico fijando el oxígeno, por lo que se evita el enranciamiento de los alimentos (Rusel, R., 1954 , Durand , G., 1952 , Scott, D., 1975).

REMOCIÓN DE OXÍGENO.

Protección de emulsiones de agua y aceite.

La mayonesa es una emulsión de aceite y huevo, que contiene del 10 al 20 % de aire. El oxígeno atrapado en la emulsión puede dar lugar a un enranciamiento y pérdida de color (Reed, G., 1949). La GO remueve el oxígeno disuelto y evita por consiguiente el desarrollo de ranciedad oxidativa (Scott, D., 1975 y Taylor, R.J., 1930).

En la producción de bebidas y refrescos cítricos.

Estabiliza los jugos cítricos, base de bebidas y refrescos embotellados, estables y concentrados, evitando así el deterioro por efecto de la luz (Scott, D., 1975) y prolonga su duración hasta su venta (Crueger, U., 1964). Se utiliza también en la estabilización de refrescos y bebidas dietéticas libres de glucosa (Fogarty, W.W., 1965).

La luz particularmente la solar y la fluorescente, deteriora las bebidas cítricas. Se creó que la luz cataliza la formación de peróxido y que ésta acción contiene componentes de los jugos cítricos, lo cual da como resultado una pérdida o cambio de sabor (Peed, S., 1969).

El oxígeno es necesario para la formación de peróxido, y los resultados, como se ve dijo, son cambios no deseados en el sabor y color de los jugos y bebidas.

Proteger de la luz estos productos, es una manera de prevenir estos cambios, pero en un supermercado mantener en la oscuridad las botellas es una propuesta impráctica.

La remoción del oxígeno es el método más adecuado y efectivo de asegurar la estabilidad del color y sabor de tales bebidas y esto se logra con la adición de un sistema de SO-catalasa (Peed, S., 1969 y Scott, D., 1975).

CAPITULO IV

MATERIALES Y METODOS

El objetivo general de la obtención de una enzima consiste en aumentar la pureza y actividad biológica de la proteína deseada, por unidad de peso, mediante la eliminación del material inactivo o de las proteínas no deseadas, mientras que al mismo tiempo se consigue un máximo rendimiento (Lehninger, A., 1951).

El primer requisito es un método específico y sensible para distinguir y medir cuantitativamente la proteína que se va aislar. En el caso de una enzima se requiere de un sistema de ensayo cuantitativo que permita determinar su actividad catalítica (Walker, D.H., 1934).

También es necesario un procedimiento para liberar la enzima en forma soluble de la célula intacta o de la estructura del tejido sin provocar pérdidas de actividad (Soper, R.K., 1930). Una vez que se ha obtenido la proteína deseada en forma soluble, pueden aplicarse métodos de fraccionamiento con objeto de separarla de las proteínas contaminantes. Por ensayo directo puede determinarse en cual de las fracciones aparece la proteína deseada y si se ha enriquecido selectivamente por aumento de la actividad específica (Lehninger, A., 1951 y Spier, R.E., 1955).

Puesto que las células de partida o el extracto crudo pueden tener centenares de proteínas diferentes, la purificación de una proteína determinada puede precisar de muchas etapas para separarla. Entre los procesos de separación utilizados para proteínas tenemos precipitaciones isoeléctricas, salinas o por solventes orgánicos

(Faucett, J.H., 1968, Satcho, S.J., 1974 y Chimneyer, D., 1965),
cromatografía de afinidad, de exclusión molecular y de intercambio
iónico (Anónimo, 1983).

Como última etapa de purificación y principalmente como control
de calidad, la proteína se somete a una u otra forma de
electroforesis, con objeto de conseguir una separación altamente
resolutiva, con respecto a las impurezas que todavía pudieran
acompañarla (Walker, J.H., 1984).

La cuantificación de proteínas totales en la medición de la
pureza de una enzima es importante para la determinación de actividad
específica.

MICROORGANISMO.

El hongo Aspergillus niger Cepe ATCC 9029 (American Type
Culture Collection, Maryland USA) se mantuvo en frascos de vidrio
de 2 ml de capacidad con 5 ml de medio sólido inclinado PDA (Papa
Dextrosa Agar (Merck)) a 4 o 5 (Anónimo, 1984).

MEDIOS DE CULTIVO

SÓLIDO.

- PDA (Merck).

LIQUIDO.

- Medio Cataloaki (Rose, A.H., 1960):

Sacarosa (Técnica Química)	5.0	%
Ca NO ₃ 512 . 2 H ₂ O (Tec. Guía)	0.2	%
Acido cítrico (Merck)	0.75	%
K HC PO ₄ (Baker)	0.75	%
K Cl (Baker)	0.025	%
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O (Tec. Química)	0.025	%
Fe Cl ₃ . 6 H ₂ O (Merck)	0.001	%
Licor de Hafa (Arancia)	2.0	%

-Medio mínimo (Anónimo, 1984):

Na NO ₃ (Técnica Química)	0.6	%
Glucosa (Baker)	1.0	%
Solución de sales	2.0	%

-Solución de sales

Mg SO ₄ . 7 H ₂ O (Téc. Guía)	2.0	%
K HC PO ₄ (Baker)	7.6	%
K Cl (Baker)	2.0	%
Elementos traza	5.0	%

-Elementos traza

Cu SO ₄ . 5 H ₂ O (Baker)	0.004	%
Fe PO ₄ . 2 H ₂ O (Merck)	0.08	%
Mn SO ₄ . 2 H ₂ O (Téc. Guía)	0.08	%
Na Mo O ₄ . 2 H ₂ O (Merck)	0.08	%

Zn SO ₄ · 7 H ₂ O (Merck)	0.08 %
---	--------

-Medio dextrinas (Gutcho, G.F., 1974):

Glucosa · H ₂ O (Baker)	1.85 %
Dextrinas de Almidón de Maíz	
Ácido CO (Alencia)	0.5 %
Licor de Maíz (Alencia)	0.42 %
Na HCO ₃ (Téc. Suñá)	0.21 %
Ag SO ₄ · 7 H ₂ O (Téc. Suñá)	0.005 %
K H ₂ PO ₄ (Baker)	0.005 %
Ácido cítrico (Merck)	0.022 %

El licor de maíz es un producto secundario en la producción de almidón y azúcar a partir del maíz, constituye una fuente equilibrada de carbono, nitrógeno, azufre y sales minerales (Knodes, A., 1967).

Tabla 4.1

El pH se ajustó en todos los casos con NaOH (Baker) -
10 M, 1 M y 5 M respectivamente en un potenciómetro Conductronic pH
20 y fueron esterilizados en autoclave Casa Mario Padilla Mod.14 a
121 ° C, 15 psig por 20 minutos.

Tabla 4.1
 Contenido del Hczer de Maíz.
 (Rhodes ,A.,1959)

	% w/w
Nitrógeno total	4
- alanina	8
- arginina	6
- Acido glutámico	6
- leucina	6
- prolina	5
- isoleucina	3.5
- treonina	3.5
- fenilalanina	2
- cistina	1
Calcio	1
Fósforo	2.5
Potasio	1.5
Carburo	25
- ácido láctico	
- polisacáridos en forma de mucilago	
- azúcares reductores	
Vitaminas	8
- riboflavina	
- ácido nicotínico	- biotina
- ácido pantoténico	- piridoxina

PROPAGACION

Siembra en sólido.

La copa fue replicada , manteniendo en placa de FDA (Merck), en cajas de Petri desechables Crile , se incubó a 37 ° C en una incubadora Gravity Convection Incubator (GSA Mod.30A).

Las conidias o esporas se cosecharon después de 5 días de incubación para ser utilizadas en el inóculo.

Inóculo.

El inóculo se hizo con una suspensión de conidias, raspadas de las cajas de Petri con espátula, en una solución estéril de Tween 20 (Sigma) al 0.01 %. Las concentraciones de conidias se estimaron por conteo en un hemocitómetro American Optical Mod.BS160-2 con un microscopio de contraste de fase American Optical .

Cultivo en líquido.

Los cultivos en medio líquido (200 ml de medio y 4.3 ml de inóculo) se crecieron en botellas de vidrio de 1000 ml de capacidad, incubadas en un orbital Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co. Inc. Mod.0.25 a temperatura constante.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las botellas se sacaron del orbital , el líquido se filtró del medio de cultivo en un estrato Mitocato (P, ras) con un soporte Buchner Gelman Sciences de 350 ml de capacidad. En este paso se utilizó papel filtro de poro rápido Whatman No.4 y una bomba de vacío Fentis Mod.1404 hasta que el micelio se compactó formando un "pastelito".

Al medio filtrado se le tomó una muestra para posteriormente medir la actividad. El medio compactado se pesó en tórneda en una Balanza gravimétrica digital Mettler Mod. PC 4400 y se lavó con agua destilada en una tela de nylon, se exprimó y se congeló a -20°C en un congelador horizontal American Mod. GL-800 en bolsas de plástico selladas con Neologrippe.

EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA (Desintegración celular).

Uno de los factores claves en la producción de enzimas intracelulares o asociadas a la célula es el proceso de desintegración celular (Rhodes, A., 1969).

Esto debe realizarse cuidadosamente, pues si el método es más vigoroso de lo necesario, las enzimas lúbles podrían ser inactivadas al ser liberadas en la solución (Suzuki, R.K., 1965).

Varios procedimientos son adecuados a nivel de laboratorio, pero todos son idóneos para operaciones a gran escala. Estos procedimientos deben ser suficientemente fuertes para romper la envoltura celular, pero al mismo tiempo gentiles para preservar la actividad enzimática. Estos conflictos frecuentemente llevan a una optimización del proceso para recibir la enzima (Rhodes, A., 1969).

La liberación de las enzimas en un 'extracto acuoso' es el primer paso en la técnica de purificación de una enzima.

Las técnicas de desintegración celular son varias, que van desde homogenizar manualmente (una de las más gentiles), hasta la utilización del ultrasonido. El método se elige en función del tipo de

células que van a desintegrarse. Los tejidos animales son los menos problemáticos para trabajar ya que carecen de pared celular, seguidos por los tejidos vegetales y por último y más difíciles de tratar son las células de levaduras, hongos filamentosos y bacterias (Rhodes, A., 1987).

El extracto se prepara, después de la desintegración celular, por centrifugación o filtrado del material insoluble. Antes de éste paso, la mezcla es reducida como un homogenizado / después es muy posible que la eranda esté presente en el líquido sobrenadante (Scopes, R.H., 1985).

En este proceso se utilizó el modelo congelado de A. niger como material crudo o prima para obtener un extracto acuoso y se probaron diferentes métodos para establecer el óptimo.

Métodos utilizados:

- autólisis celular
- solubilización química
- homogenizado en licuadora
- trituración
- ultrasonificación

Técnicas de desintegración celular utilizadas (Scopes, R.K., 1965 y Walker, J.M., 1964).

Gentiles

Lisis celular	Suspensión del micelio en agua.	Disrupción osmótica de la membrana celular.
---------------	---------------------------------	---

Solubilización química.	Extracción con tolueno.	La membrana celular se solubiliza parcialmente.
-------------------------	-------------------------	---

Moderados.

Homogenizado.	Líquido con amortiguador.	Se rompen las cadenas de células y algunas de éstas también
---------------	---------------------------	---

Trituración	El micelio se tritura congelado y con un abrasivo.	Se "cortan" la pared y la membrana.
-------------	--	-------------------------------------

Vigerosos.

Ultrasonización	Sonicator.	Causa desintegración por alta presión que ejerce el sonido
-----------------	------------	--

Autólisis celular.

El micelio congelado se suspendió en agua destilada en una relación de los volúmenes (ml) de agua por gramo de micelio congelado, en frascos de vidrio y se mantuvieron a 4 O C durante cinco días.

Una vez que transcurrió este tiempo, se centrifugó en una centrífuga RC-3 Bourvall. a 10,000 rpm por 15 minutos y a 4 O C en un rotor de ángulo fijo 35-34 . El precipitado se desecó.

Solubilización química.

El micelio se suspendió en tolueno (Droguería La Paz) a una temperatura de 35-40 O C, en una relación de 2 ml de tolueno por cada gramo de micelio congelado, durante 15 minutos. Para mantener constante la temperatura se utilizó un baño de agua caliente Brinkmann Instruments, Inc. Mod. B-435 con control automático de temperatura. A continuación se lavó con amortiguador de acetatos 5 mM, pH 5.1, se decantó, resuspendió en el mismo amortiguador, se agitó durante toda la noche con un agitador magnético Felisa Mod.130 a 4 O C en un cuarto frío. Después de esto se centrifugó como en el método anterior.

Homogenización en Hielo, a.

El micelio se suspendió en amortiguador de acetatos 5 ml, pH 5.1, a 4 o 5 C, en una relación de 3 ml de amortiguador por cada gramo de micelio congelado. Después se homogenizó en una moladora Moulinex previamente enfriada a 4 o 5 C, durante 10 minutos en lapsos de 2 minutos cada uno. Posteriormente se filtró con vacío en un embudo Buchner (Fisher Scientific) y un matraz Kitazato (pyrex) sobre hielo. En este caso no se centrifugó debido a que al hacer unas pruebas de centrifugación, el precipitado no se compactó bien.

Trituración.

El micelio congelado se mezcló con un poco de vidrio en polvo, en un mortero previamente enfriado a -10° C. Se bañó con nitrógeno líquido (Liquid Carbonic, Univ. Carolina), y se trituró con el pistilo hasta que quedó un polvo fino y uniforme, agregando periódicamente nitrógeno líquido para evitar el descongelamiento del micelio. Una vez hecho el polvo, se suspendió en amortiguador de acetatos 5 ml, pH 5.1, en una relación de 2 ml por gramo de micelio congelado (antes de triturarlo), y se centrifugó como en los métodos anteriores.

Ultrasonificación.

El micelio se suspendió en 3 vol. de amortiguador de acetatos 5 ml, pH 5.1, frío y se colocó, sobre hielo, en un sonicador Fisher Sonic Dismembrator Mod.100 durante 30 y 60 minutos. A continuación se centrifugó como en los métodos anteriores.

PROCEDIMIENTOS VARIOS.

Determinación de aflatoxinas.

El género Aspergillus está formado por varias especies, algunas de ellas segregan toxinas que son peligrosas para el hombre por ser cancerígenas, como es el caso de Aspergillus flavus (Klopper, F., and Perkins, A., 1952; Thoma, C., 1943). Estas toxinas, denominadas "aflatoxinas" han sido reportadas recientemente en otras especies como por ejemplo en algunas cepas de A. oryzae que se utiliza industrialmente.

Por esta razón se hizo una prueba por duplicado, para determinar si la cepa de A. niger con la que se iba a trabajar produce aflatoxinas.

La determinación se hizo por cromatografía en capa fina, utilizando una solución de acetona para la extracción de las muestras (Lynch, M.I., 1972). Esta es una adaptación de la técnica empleada para la detección de aflatoxinas en semillas y granos almacenados. La cantidad mínima detectable de aflatoxinas es de 1 microgramo/Kg (Eweis, B., 1972).

Técnica de determinación de aflatoxinas (Zweig, 3, 1972)

- A 100 ml de muestra, en este caso el medio de cultivo donde se creció el hongo, se le agregaron 5 vol. de acetona (Baker) al 70 %, se homogenizó y se filtró para separar las grasas.
- Este filtrado se trató para eliminar pigmentos precipitándolos, con una mezcla de agua y acetato de plomo (Prod. Quím. de Monterrey). Se filtró nuevamente y se concentró por evaporación en baño de agua caliente.
- Este concentrado se extrajo con cloroformo (M) en un embudo de separación por decantación.
- El extracto se inyectó en una columna de 2 cm de diámetro por 15 cm de alto que contenía 10 cm de Florisil Gel (Merck) y encima 3 cm de sulfato de sodio anhidro (Baker), para quitar agua y algún pigmento remanente.
- Se concentró nuevamente por evaporación, hasta llegar a 2 ml.
- Se inyectarán 5 y 10 microlitros del concentrado en una cromatoplaca, de 10 por 20 cm, de Sílica Gel con indicador de fluorescencia HF-254 (Merck).
- Se utilizó como eluyente una solución de metanol (Baker)-cloroformo (Baker) en una relación de 3:77.
- El eluyente se dejó correr hasta 3.5 cm de la placa, la colocación de la banda de aflatoxinas se determina por su capacidad de emitir fluorescencia cuando es excitada con luz ultravioleta de onda corta y su $R_f = 0.076$.

Este análisis es semicuantitativo y se comparó contra una muestra estándar de aflatoxinas (Sigma).

Quantificación de proteínas.

Método de Bradford (Bradford, M.M., 1976).

En este método descrito para proteínas se eliminan la mayoría de los problemas que envuelven procesos como el de Lowry (Cooper, S.T., 1977), que está sujeto a interferencias por diferentes componentes como iones K^+ o Hg^{2+} , EDTA, Tris, amonio, etc., y es fácilmente utilizable para procesar grandes cantidades de muestras así como puede adaptarse para equipo automático.

Este método está basado en la observación de que el azul coomassie brillante G-250 existe en dos diferentes formas de color: rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. El complejo proteína-colorante tiene un coeficiente de extinción alto lo que le da una gran sensibilidad en la medición de las proteínas, la unión del colorante con la proteína es un proceso rápido (aproximadamente 2 minutos) y el complejo proteína-colorante permanece disperso en solución por un período relativamente largo (aproximadamente 1 hora), por lo que este proceso es rápido y no requiere cronometraje para el ensayo.

Este proceso no tiene interferencia por cationes tales como K^+ o Na^+ , ni por carbonatos. Los iones compuestos que interfieren son grandes cantidades de sulfatos, como SDS o Triton X-100 (6).

Una dificultad observada, es la tendencia del complejo proteína-colorante de unirse a las paredes de la celda de espectrofotometría, lo que da como resultado una celda teñida de azul que posteriormente dará error en las lecturas. Para evitar esto, puede enjuagarse la(s) celda(s) con una solución de agua y acetona o con HCl 0.1 M. Esta unión sólo se observa en las celdas de cuarzo y puede ser eliminada usando celdas de plástico.

Preparación del reactivo de Bradford.

- 100 mg de azul brillante coomassie G-250 (Sigma) se disuelven en 50 ml de etanol (Merck) al 75 %.
- A esta solución se le agregan 100 ml de ácido fosfórico (baker) al 85 % (w/v).
- La solución resultante se diluye a un volumen final de 1 litro.
- Las concentraciones finales en el reactivo son: azul coomassie 0.01 % (w/v) , etanol 4.7 % (w/v), y ácido fosfórico 6.5 % (w/v).

Curva patrón.

Se prepara una solución gravimetricamente de albúmina de suero bovino (BSA) fracción V de Conn A-4000 (Sigma) 0.1 % (w/v), la cual debe tener una absorbancia de 0.7 a 280 nm en una celda de 1 cm de paso de luz.

$$\begin{aligned} & 0.1 \% \\ E & = 0.7 \\ & 280\text{nm} \end{aligned}$$

- En tubos de ensayo, se pipetea para la curva patrón 15, 30, y 45 microlitros de la solución de BSA.
- A cada tubo se le agregan 2 ml de reactivo de Bradford.
- Después de 2 minutos y antes de una hora, se lee la absorbancia de cada tubo a 575 nm en un espectrofotómetro, contra un blanco de 2 ml de reactivo de Bradford sin proteína.
- La concentración de proteína se grafica contra la absorbancia correspondiente para formar la curva patrón, que posteriormente servirá para determinar la concentración de proteína de muestras o fracciones problema.

Preparación de las muestras.

Las muestras se preparan pipeteando de 10-100 microlitros de muestra y añadiéndole 2 ml de reactivo de Bradford.

A continuación, una vez que pasaron 2 minutos y antes de una hora, se leen a 575 nm en un espectrofotómetro.

La absorbancia se interpola en la curva patrón y así se obtiene la concentración de proteínas.

PURIFICACION.

Precipitación con solventes orgánicos.

La adición de un solvente orgánico, como etanol o acetona, en un extracto acuoso que contiene proteínas tiene varios efectos, los cuales combinados, conducen a la precipitación de las proteínas (Scopes, R.K., 1965).

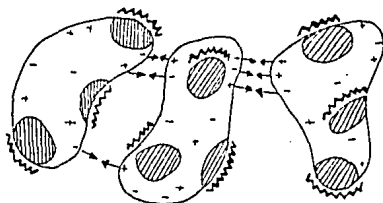
El efecto principal es la reducción de la actividad del agua. El poder disolvente del agua para las moléculas hidrofílicas cargadas disminuye cuando la concentración del solvente aumenta (Scopes, R.K., 1965), en otras palabras disminuye la solubilidad de la mayor parte de las proteínas en el agua (Lenninger, A., 1981).

Esto puede ser descrito en términos de una reducción de la constante dieléctrica del solvente, o simplemente de un desplazamiento de la mayor parte de agua (Scopes, R.K., 1965). Puesto que el etanol posee una constante dieléctrica menor que la del agua (Tabla 4.2), su adición a una disolución acuosa de proteínas incrementa las fuerzas de atracción entre las cargas opuestas, disminuyendo de este modo el grado de ionización de los grupos R de la proteína. Como resultado las moléculas de proteína tienden a agregarse y precipitan (Lenninger, A., 1981).

Tabla 4.2 .
Lohninger, A., 1981

Cte. dieléctricas de algunos líquidos.(b)	
agua	80
Metanol	38
Etanol	24
Acetona	21.7
Benceno	2.3
Hexano	1.9

Una representación bidimensional de las proteínas en una mezcla de agua-solvente orgánico se muestra en la siguiente figura:



~~~~~ = solventes orgánicos.

● = parche hidrofóbico.

Agregación de las proteínas por interacciones en una mezcla de agua-solvente orgánico (Esposito, 1980, 1985).

Así la agregación ocurre por interacción entre las áreas cargadas positivamente, en la superficie de las proteínas, y la disminución de las repulsiones electrostáticas debido al solvente en estas áreas.

Otro factor que afecta la precipitación con solventes orgánicos es el tamaño de la molécula y el porcentaje de solvente necesario para precipitarla.

El solvente a utilizar debe ser completamente miscible en agua, no reaccionar con las proteínas y tener un buen efecto precipitante. Los solventes más ampliamente usados son el etanol y la acetona. Los otros solventes que pueden utilizarse son: metanol, n-propanol, i-propanol, dioxan, metoxietanol y algunos éteres y cetonas.

La seguridad también debe considerarse en términos de inflamabilidad y vapores tóxicos y nocivos. Por esa razón el dioxan y el metoxietanol deben ser eliminados de la lista (Scopes, R.N., 1985).

Una desventaja de este método es que el solvente puede desnaturar las proteínas a temperaturas sobre cero, por lo tanto la temperatura a la que se trabaja debe mantenerse muy baja (bajo cero) (Lehninger, A., 1981).

La razón por la que ocurre la desnaturalización, es que a temperaturas altas las fuerzas hidrofóbicas internas que ayudan a mantener la estructura de la proteína son muy fuertes y rígidas y las moléculas de solvente entran y rompen éstas fuerzas, que al perderse dan como resultado pérdida de la conformación de la proteína y por consiguiente de la actividad en el caso de una enzima.

Por el contrario a bajas temperaturas la conformación de la proteína es flexible y las moléculas de solvente que penetran a la estructura solo causan desestabilización (Scopes, R.N., 1985).

Técnica de purificación.

El trabajo se realizó a 4 °C en un cuarto frío (Faucett, J.W., 1965 y Gutcho, S.J., 1974).

Se preparó una mezcla de etanol (Merck) al 93 % y gluconato de sodio (Sigma). Se emplearon 2 g. de gluconato por litro de etanol, y dos volúmenes de esta mezcla por volumen de extracto (sobrenadante). El gluconato se añadió al etanol previamente enfriado a -10 °C. con agitación rápida en un agitador magnético Felisa Mod.310.

Mientras la mezcla se agitaba, el extracto se añadió con un cubido de seguridad (papel) por debajo de la superficie del etanol. Se agitó por 15 minutos más.

La mezcla se dejó reposar durante una hora para que la enzima precipitara.

La mezcla de agua y alcohol se decantó, y el residuo se filtró, se lavó con etanol frío, se secó con vacío durante 10 horas para eliminar el etanol. El polvo se resuspendió en amortiguador de acetatos 5 mM, pH 5.1.

Nota: Al añadir el extracto la temperatura de la mezcla se elevó hasta 10 °C por lo que las veces siguientes se trabajó sobre una mezcla de hielo y sal.

CONTROL DE CALIDAD. (Determinación de pureza).

Ensayo de actividad.

Para determinar el ensayo de actividad rutinario se probaron tres condiciones diferentes para la actividad enzimática de GO (el 2,4-Diclorofenol-inoludonol, el *O*-Fenylendiamina y el *O*-Dianisidina, se seleccionó el más eficiente. En el capítulo de discusión se exponen las ventajas, y desventajas de cada uno de los arreglos probados.

La actividad enzimática se determinó por la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por la reacción subsiguiente con peroxidasa y *O*-Dianisidina según Sigma (Boletín Técnico No. 510).

El sistema para la prueba estándar, consiste en lo siguiente en un volumen total de 3.1 ml:

2.1 ml de *O*-Dianisidina (Sigma) 0.21 ml en amortiguador de acetato de sodio 5mM, pH 5.1.

0.5 ml de glucosa anhidra (Técnica Química)

0.25 mM en H<sub>2</sub>O destilada.

0.1 ml de peroxidasa (Sigma) 80 unidades

peroxidasa/ml en H<sub>2</sub>O destilada.

Esta mezcla se incuba a 35°C por 2 minutos y a continuación se lee en un espectrofotómetro Farring-halmer MD6.559A uv/vis a 500 nm.

Se le agrega 0.1 ml de solución de GO glucosa-oxidasa (Sigma) 0.5 unidades/ml en amortiguador de acetato de sodio 5 mM, pH

5.1 para la prueba estándar y la misma cantidad de las fracciones de los pasos de purificación.

Se registra el cambio de absorbancia a 500 nm 2 o 4 minutos y se obtiene el incremento de absorbancia por minuto.

Cálculo:

$$\frac{\Delta A_{500nm/min} \times V_1}{V_2 \times \epsilon \times d} = \text{unidades micromol por ml}$$

7.5 ml de sol. de 50 de sol. de 60.

Donde:

$V_1$  es el volumen de la mezcla de reacción.

$V_2$  es el coeficiente de extinción milimolar para la D-Dioxidasa a unidades.

Una unidad de 50 fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 micromol de Beta-D-glucosa a ácido glucónico y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto a 37 °C y pH 5.1.

Las actividades específicas, son las unidades de actividad enzimática por  $\mu$ g de proteína (U).

Electroforesis.

Probablemente la técnica más utilizada para analizar mezclas de proteínas es la electroforesis en gel de poliacrilamida (Fagatry, 1988). Esta es una variación de la electroforesis de zona (Lehringer, A., 1981).



Las proteínas son disociadas en sus cadenas polipeptídicas con electrolitos, por un detergente aniónico el Dodecil Sulfato de Sodio (SDS, por sus siglas en Inglés). El SDS, como agente desnaturalizante y solubilizante, induce cambios conformacionales en la proteína. La naturaleza inespecífica de la unión del SDS con las proteínas de diferentes estructuras, requiere de cambios conformacionales de carácter similar dentro de cada cadena polipeptídica (Feldmanstrom, A., 1977).

En una solución de SDS (Sigma) y 2-mercaptoetanol (Sigma), las proteínas se disocian en subunidades en forma de barra, las cuales tienen un diámetro constante, mientras que el eje longitudinal varía en proporción al peso molecular (Feldmanstrom, A., 1977).

De inherencia una carga negativa por molécula de SDS ligada a la molécula de proteína, es decir, la cadena polipeptídica se encuentra recubierta por una capa de moléculas de SDS y los grupos sulfato cargados negativamente que posee el detergente, se hallan asociados al medio acuoso (Kerninger, A., 1981).

El efecto tamizador de los geles de acrilamida es un factor importante en estas separaciones. La densidad de la trama (masal del gel) y el tamaño del poro, lo da la concentración de la acrilamida (Sigma) y metilen - bis - acrilamida (Sigma) (Feldmanstrom, A., 1977).

El campo eléctrico suministra, la fuerza impulsora para que migre la proteína y la velocidad de migración viene determinada principalmente por la masa de la partícula SDS-polipeptido, según el principio de exclusión molecular. Para calibrar un determinado sistema

de gel, se hacen algunas proteínas de peso molecular conocido, que actúan como marcadores, con objeto de efectuar la comparación y saber el peso molecular de la proteína caseína / el de las proteínas que pudieran acompañarla / por lo tanto el grado de pureza (Lehninger, A., 1981).

En éste caso se utilizaron geles horizontales de SDS-poliacrilamida al 7 % y de gradiente que va del 3 % al 20 %, y un equipo de electroforesis de LKB que consta de:

- Modeltop II 0017
- Power Supply
- Thermostatic circulator.
- LKB BRACMA
- LKB BRACMA.
  
- Modeltop II 0117
- Gels Gel Dryer 2003
- Electrophoresis Unit
- LKB BRACMA.
- LKB BRACMA.

## CAPITULO V

### RESULTADOS

#### Determinación de aflatoxinas.

Los ensayos para determinar la presencia de aflatoxinas en el medio de cultivo, fueron negativos para la cepa utilizada. No hubo banda característica (R<sub>F</sub> 0.175) al observar la placa de cromatografía bajo luz ultravioleta.

#### Cultivo.

Los resultados de las pruebas realizadas para determinar las condiciones óptimas de cultivo del hongo para obtener la máxima producción posible de OO, se muestran en las tablas 5.1, 5.2 y 5.3. Como se observa, la máxima actividad se obtuvo con el medio dextrinas y la temperatura y tiempo de crecimiento óptimo para el máximo rendimiento fueron 37°C y 24 hrs. El rendimiento promedio de micelio húmedo exprimido, fue de 21 g por litro de medio de cultivo. También se demuestra en estas tablas que en ningún caso se puede recuperar actividad en el medio de cultivo directamente.

Tabla 5.1

Comparación de actividad específica en el extracto crudo \* de A. niger en tres diferentes medios de cultivo.  
Condiciones de operación; 200 rpm, 24 hrs, 28 oC.

| Medio de cultivo | g    | Filtrado |
|------------------|------|----------|
| Zeteleaki        | 1.16 | -        |
| Mínimo           | 0.31 | -        |
| Dextrinas        | 1.85 | -        |

\* El extracto para esta comparación se realizó congelando el micelio con nitrógeno líquido y triturando con vidrio en polvo en mortero.

Tabla 5.2

Comparación de actividad específica en el extracto crudo \* de A. niger a tres diferentes temperaturas de crecimiento (medio dextrinas).  
Condiciones: 200 rpm, 24 hrs. ( $\bar{X}$  entre 7 cultivos)

| Temperatura oC | g    | Filtrado |
|----------------|------|----------|
| 28             | 1.04 | -        |
| 30             | 0.32 | -        |
| 37             | 2.56 | -        |

\* El extracto se hizo como en la tabla 5.1

Tabla 5.3

Comparación de actividad específica en el extracto crudo a diferentes tiempos de crecimiento (medio dextrinas).

Condiciones: 200 rpm, 37 °C. (X entre 7 cultivos)

| Tiempo (hr) | Q    | Filtrado |
|-------------|------|----------|
| 20          | 0.35 | -        |
| 24          | 2.56 | -        |
| 40          | 3.42 | -        |

El extracto se hizo como en las tablas anteriores.

#### Obtención del extracto.

Los resultados de las pruebas realizadas para establecer el mejor método de extracción se muestran en la tabla 5.4. Como se observa en esta tabla, la máxima actividad se obtiene cuando la enzima se extrae por trituración o sonicación del micelio, pero para el método rutinario se seleccionó un método combinado de extracción ácida y homogenización. Los factores se discuten en el capítulo siguiente.

Tabla 3.4

Comparación de la actividad específica entre los diferentes métodos de extracción.

Medio: dextrinas, 200 rpm, 24 hr., 37 °C.

| Corrida No. !   | 005 !  | 006 !  | 008 !  | 009 !  | X !    |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Mat. Extrao !   |        |        |        |        |        |
| Concentración ! | 2.13 ! | 1.97 ! | 2.32 ! | 2.07 ! | 2.12 ! |
| Trituración !   | 2.07 ! | 2.07 ! | 2.01 ! | 2.02 ! | 2.32 ! |
| Manejamiento !  | 1.51 ! | 1.17 ! | 1.01 ! | 1.13 ! | 1.21 ! |
| Salob. Gúñe !   | 0.42 ! | 0.00 ! | 2.37 ! | 0.00 ! | 1.48 ! |
| Est. Acuesa !   | 0.37 ! | 0.59 ! | 0.31 ! | 1.21 ! | 0.91 ! |
| Est. Acuesa !   |        |        | 1.32 ! | 1.70 ! | 1.76 ! |
| y Manojer, !    |        |        |        |        |        |

### Purificación.

Los resultados de el paso de purificación se muestran en la tabla 5.5 . La actividad específica se aumentó de 1.7 a 4.3 con un rendimiento del 24 % y un factor de purificación de 2.5. Las razones por las que no se utilizaron más pasos de purificación se discuten en el capítulo de discusión.

Tabla 5.5

Tabla de purificación.

|                   | Vol<br>ml | U/ml | U<br>tot | Impurezas |     | Q    | Rend<br>% | Factor<br>de Purif. |
|-------------------|-----------|------|----------|-----------|-----|------|-----------|---------------------|
|                   |           |      |          | mg/ml     | tot |      |           |                     |
| Extracto<br>crudo | 400       | 0.17 | 71.6     | 0.100     | 12  | 1.70 | 100       | 1                   |
| PP con<br>etanol  | 10        | 1.70 | 17       | 0.75      | 7.7 | 4.87 | 24        | 2.5                 |

Actividad.

Para establecer el ensayo de actividad rutinario se probaron tres cromógenos distintos :

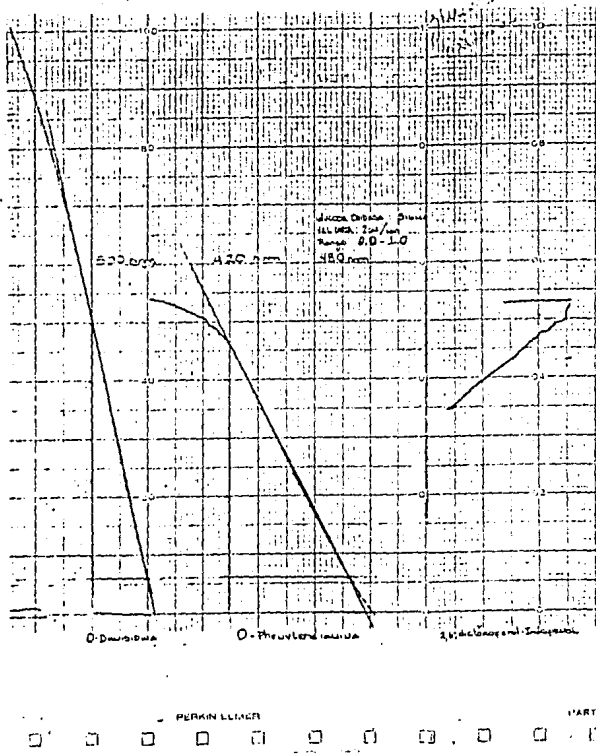
- El 2,6, Dinitrofenol-Indifenol, en ensayo directo y en el que se observó la desaparición de color azul.

El 3- Fenil,ta-dioxina OPD en ensayo acoplado a Peroxidasa, en este el desarrollo de color amarillo fue el indicador de actividad enzimática.

- Y por último se utilizó la O-Dianisidina también en ensayo acoplado a Peroxidasa en el que se observó desarrollo de color rojo.

Este último fue el que se seleccionó para el ensayo rutinario. En la gráfica siguiente se muestra la eficiencia de cada cromógeno.





Comparación de tres cromógenos distintos para la determinación de actividad enzimática de la glucosa oxidasa.

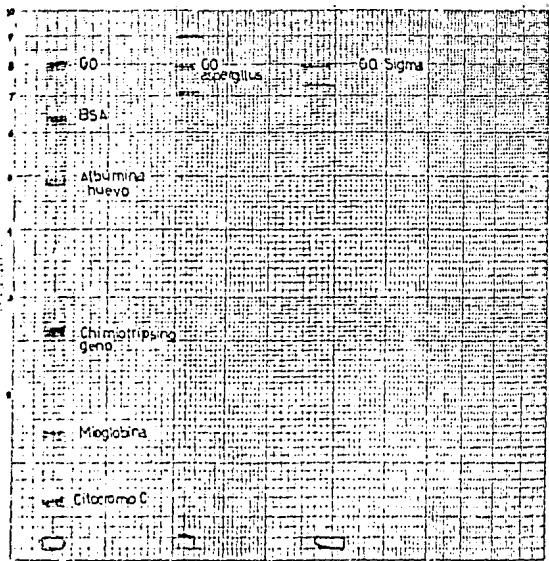
Para los tres cromógenos se utilizó la misma enzima de Sigma en una concentración de 0.5 unidades por ml y 100 microlitros para cada cromógeno.

Velocidad de la carta: 2 cm/min

Rango: 0.00 - 1.00

## Electroforesis.

En este proceso la electroforesis sólo se utilizó como control de calidad, para confirmar los datos obtenidos con el ensayo de actividad. Esto fue debido a que el tratamiento de las proteínas para este tipo de electroforesis, las desnaturaliza y por lo tanto la enzima no se puede recuperar.



## METODO ESTABLECIDO

- El hongo se sembró en medio PDA en cajas de petri por el método de pipeteo.
- Se incubó 5 días a 37 ° C. hasta el desarrollo de conidias o esporas.
- Se traspasaron las conidias con una solución estéril de Tween 20 al 0.01%, para hacer una suspensión (inóculo).
- Se inoculó en botellas de 1 litro de capacidad que contenían 250 ml de medio líquido estéril y se incubó por 24 hrs en un orbital a 200 rpm y 37 ° C.
- Transcurrido este tiempo, el micelio se filtró, se lavó con agua destilada, se exprimió, y se congeló en bolsas de plástico.
- El micelio congelado se dejó en agua destilada por 5 días a 4 ° C, en una relación de 2 vol de agua por gramo de micelio congelado.
- Pasado este tiempo se homogeneizó en una licuadora en cuarto frío a 4 ° C.
- El extracto se centrifugó, el precipitado se desecha.
- Se filtró, y se agregó con un embudo de seguridad a una mezcla de etanol y gluconato de sodio fría sobre hielo con sal, agitando 15 minutos.

- Se dejó reposar para que precipitara.
- Se decantó el líquido, el precipitado se lavó con etanol frío, se decantó nuevamente y por último se secó con vacío para eliminar el etanol.
- El precipitado se resuspendió en unortiguador de acetatos.

CEPA DE A. niger.

!

SIEMBRA EN CAJA DE PETRI

!

INCUBACION 5 - 10 DIAS.

!

ESPECIMIENTO EN MEDIO

LÍQUIDO

!

FILTRADO \* -----> EL MEDIO SE

!

DESECHA.

CONGELADO DEL MICELIO

!

EXTRACCION ACUOSA \*

!

HOMOGENIZADO

!

CENTRIFUGACION -----> EL FP SE

!

DESECHA.

FILTRADO \*

!

FP CON ETANOL Y  
GLUCONATO DE SODIO

!

LAVADO CON ETANOL

!

SECADO -----> ALMACENADO

!

RESUSPENSION EN  
ANTIGUADOR \*

\* Actividad analítica , cuantificación de proteínas y  
electroforesis.

## CAPITULO VI

### DISCUSION.

Como ya se mencionó , la *CC* es una enzima intracelular, sin embargo la literatura curiosamente está desprovista de descripciones de los métodos usados para sacar o deslizar la enzima del micelio. Scott (1973) dice que el micelio simplemente se hace pedazos y la enzima pasa a la solución, después de uno o más pasos de purificación, no establecidos, la enzima se precipita usando acetona o etanol.

Sarker y Shirley en 1960 (Fogarty, M.W., 1983) describen en una patente el uso de una enzima lítica de *Aspergillus niger* ( ) en la liberación de *CC* de *Aspergillus niger*. La sonicación, sin embargo, produce preparaciones con actividades ligeramente mayor (Fogarty, M.W., 1983 , Ross, A.R., 1980).

Las preparaciones comerciales son extraídas precipitando la enzima de un extracto con etanol o acetona y se estabiliza con la adición de materiales a propósito. Estas preparaciones contienen varias enzimas contaminantes de significancia variable como por ejemplo la catalasa (Fogarty, M.W., 1983).

Svedala y Masse, en 1980 obtuvieron una producción baja de enzima electrofóticamente pura, a partir de una preparación comercial de extracto crudo de *A. niger*, por un método que consiste en los siguientes pasos:

- Extracto crudo (Ste-2, Miles Lab.)
- Difusión
- Cromatografía en columna
- Recristalización salina
- Difusión
- Cromatografía en DEAE
- Recristalización salina
- Difusión.

Schmidt, L., et al (1969) (Gutano, S.J., 1974) propuso los siguientes pasos de purificación:

- Molienda del micelio
- Precipitación con isopropanol y metanol
- Secado.

Moser, et al en 1967 utilizó un proceso similar al de Švoboda y Mastey (1965) para purificar GG de Fenicillium amagasakiense, partiendo también de un extracto crudo comercial llamado Dioxine (Nagase Co., Ltd.).

En la bibliografía consultada las condiciones de obtención del crudo, no están bien documentadas, por lo que se dedicó atención especial al establecimiento de este paso.

Se hicieron varias pruebas, como ya se mostró en los resultados; en el caso de la extracción con tolueno, algunas veces dió buen resultado, pero en otras ocasiones inactivó por completo a la enzima por lo que al no ser reproducible se descartó.

La sonicación y trituración del micelio dieron los mejores resultados y son óptimos para pruebas a nivel laboratorio, pero como métodos de extracción a gran escala no son factibles o incrementarían incesantemente el costo de la enzima por lo que también se descartaron.

Las condiciones de extracción se establecieron realizando una combinación de dos métodos; extracción acuosa por 3-4 días a 4°C y homogenización en licuadora en frío, seguidas de centrifugación o filtrado para clarificar el extracto.

Este método de extracción fue a la vez un paso de purificación; esto es debido a que las células contienen muchas sales y materiales insolubles, los cuales están cargados, como por ejemplo proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, etc.

La fuerza iónica dentro del citoplasma de una célula típica está en un rango de 0.10 - 0.2 M y bajo estas condiciones las proteínas citoplasmáticas son "solubles" y pueden moverse libremente dentro de la célula. Si se homogeniza con dos o tres volúmenes de agua, la fuerza iónica pasa a ser de 0.05 M o menor. Bajo estas condiciones las partículas cargadas pueden actuar como intercambiadores iónicos y formar agregados que precipitan (Scopes, R.N., 1965), quedando en el



agua sólo azúcares sencillos, proteínas que son solubles en ella, con lo que se elimina todo el material infeccioso.

En el paso de purificación precipitando la enzima con un solvente orgánico; el etanol, se presentaron algunos problemas en las primeras pruebas, que resultaron negativas ya que no precipitaba nada o cuando lo hacía, la enzima era inactiva. El primer problema fue debido a que el extracto estaba demasiado diluido lo que se corrigió disminuyendo el volumen de agua al hacer el extracto y se detectó al medir la concentración de proteínas en el mismo. El segundo problema que se presentó se debió a que la temperatura de la mezcla extracto-etanol está a 7 °C al añadir este último, a pesar de estar previamente enfriado a -20 °C, se trabajó a 4 °C dentro de un baño de frío. Este problema se solucionó trabajando sobre una mezcla de hielo y sal además de las precauciones ya mencionadas.

El etanol se seleccionó como solvente orgánico precipitante, debido a varias razones: es fácil de obtener, implica poco o ningún riesgo al manejarlo, no tiene vapores tóxicos y según datos publicados por Foxcett, J.W., en 1966, se obtiene un mayor rendimiento con etanol que con otros solventes como serían metanol, acetona o isopropanol.

La pureza de la enzima se dejó en un factor del 2,8, ya que para el principal uso que se le da a la 3G, que es el de cuantificación de glucosa en sangre, este grado de pureza es suficiente y por otro lado, para que un proceso de producción sea costeable, debe realizarse en el menor número posible de pasos.

Se hicieron algunas pruebas de cromatografía de afinidad con azul de cianuro, pero fueron negativas ya que la enzima se eluía con todo y colorante y este último no podía desligarse de la SU. Además implicaba el incluir un paso más para poder almacenarla que era la hidrólisis, lo que incrementaría el costo; debido a esto se descartó.

En cuanto al ensayo de actividad se refiere, los dos primeros métodos utilizados para establecerlo, se descartaron. Esto fue debido a que el D.L- Dicalcio fenol-indurenol fue muy lento, inexacto y solo colorimétrico, no tiene una unidad de referencia.

El D-Fenylamino aunque es más sensible y exacto tiene la desventaja de que se oxida espontáneamente con la luz y después de 2 o 3 días tenía que prepararse de nuevo, y por lo mismo estaba sujeto a mediciones erróneas.

El método seleccionado tiene las ventajas de ser exacto, rápido además de que es el recomendado por Sigma, que fue el patrón de referencia y no presenta las desventajas de los dos anteriores.

## CAPITULO VII

### CONCLUSIONES.

El proceso de producción de esta enzima, va desde el establecimiento de las condiciones óptimas para el desarrollo del microorganismo hasta su almacenamiento.

Se observó una estimulación de la producción de enzima por el microorganismo por las toxinas contenidas en el medio de cultivo. Este efecto ha sido reportado con anterioridad para este hongo y otros microorganismos (Garnaway, M., 1934). Por otro lado A. niger requiere de ácido nicotínico, biotina, etc. para su crecimiento (Garnaway, M., 1934) los cuales le fueron proporcionados por el licor de maíz.

Se confirmó que la GC en el caso de este microorganismo, es intracelular, puesto que nunca se recuperó actividad en el medio de cultivo bajo ninguna condición de temperatura o tiempo.

Se estableció un método de extracción específico para esta enzima, combinando dos métodos y consiguiendo un mayor rendimiento. Este método presenta las ventajas de no ser muy estricto, ser moderado, simple y de bajo costo, además es factible de ser escalado a nivel planta piloto.

El método de purificación fue una modificación y combinación de varios métodos descritos en el menor número de pasos y se obtuvo un polvo estable, fácil de almacenar y con un costo razonable.

La actividad de la enzima fue suficiente para la cuantificación de glucosa en sangre y aunque electroforéticamente no es pura, los contaminantes que le acompañan no afectan ni intervienen en su actividad.

Pudo observarse que a pesar de haber una o varias metodologías descritas, es necesario desarrollar nuevas técnicas y opciones de acuerdo a las posibilidades y equipo del laboratorio donde se va a realizar el trabajo. Por otro lado hay que estar conscientes de que siempre surgen problemas, detalles no descritos en la literatura.

La purificación de una enzima implica no solo tener habilidad y conocimientos técnicos necesarios sino también el familiarizarse con el comportamiento, en este caso, tanto del hongo como de la enzima y el poder o saber interpretar las fallas o errores que implica un proceso de esta índole.

## CAPITULO VIII

### RESUMEN

La glucosa oxidasa (E.C. 1.1.3.4.) es una de las enzimas que más usos se le han encontrado, entre otros ; en la Química Clínica en la cuantificación de glucosa en líquidos corporales ; en la Industria de los alimentos, en la producción de ácido glucónico, como estabilizador de bebidas cítricas ; y en la Industria Farmacéutica, en la elaboración de tiras reactivas, por citar algunos ejemplos.

La glucosa oxidasa, además, es una de las pocas enzimas que reúne todas las características para ser producida industrialmente estas características son:

- tiene amplia aplicación.
- se obtiene de un microorganismo, lo que permite tener un control absoluto de la materia prima , /
- está aceptada internacionalmente.

La glucosa oxidasa comercial actualmente es obtenida, en otros países, principalmente a partir de Aspergillus niger, pero también se encuentra en otros microorganismos como por ejemplo en varias especies de Penicillium.

En este trabajo se estableció un método para la producción, extracción y purificación de esta enzima a partir de Aspergillus niger.

## CAPITULO IX

### BIBLIOGRAFIA.

- Anonimo 1983 . Ultrage!, Magnage. and Trisacryl.  
Practical guide for use in affinity  
chromatography and related techniques.  
2da Edición. LKB Societé Chimique  
Pontet-Girard. France.
- Anónimo 1984 . Catalogo de la colección de cultivos  
microbianos del Departamento de Biotecnología  
Biotecnología. 1ra Edición. C.INV.EST.AV.  
IPN.
- Anónimo 1985 . Boletín del Instituto Mexicano del  
Comercio Exterior. 2da Edición. IIC,Mexico,D.F.
- Atlas, M.P., 1984 . Microbiology, fundamentals and  
applications. McMillan Publishing Co. Inc .  
pp 707-723.
- Berman, T.E., 1983 . Enzyme Handbook. volume 1. Second  
printing. Springer-Verlag. Berlin, Germany.
- Bradford, M.M., 1976 . "A rapid and sensitive method for  
quantitation of microgram quantities of protein  
utilizing the principle of protein-dye  
binding". Analytical Biochemistry. 72, 248-254.
- Cells, C. y Col. 1984 .La Economía Mexicana.Análisis 63.  
Publicaciones Ejecutivas de México. Es. Abeja S.A.  
México, D.F.

- Cooper, G.T., 1977 . The tools of biochemistry.Second edition. John Wiley & Sons. New York.
- Crueger, W., and Crueger, A., 1984 . Biotechnology. A text book of industrial microbiology.Third edition Sinaver Associated Inc. Sunderland, Ma.
- Durand, G., et Monsan, P., 1982 . Les Enzymes. Production e utilisations industrielles.Biochimie Appliquee. Ed. Gauthier-Villars. Bordas,Paris.
- Faucett, J.W., et al, 1963 . U.S.Patent 3102081 "Enzyme precipitation process".
- Fehrenstrom, H., 1977 . SDS and Conventional polyacrylamide gel electroforesis with LKB. LKB-Produkter AB Brroma, Sweden.
- Fogarty, M.W., 1985 . Microbial Enzymes and Biotechnology Chapter 2. Applied Science Publishers, LTD. London-Essex, England.
- García, H.F. 1983 . Aspectos sobre escalamientos de sistemas de recuperación de enzimas. Biotecnología de enzimas. Editado por Carlos Huitrón.UNAM, México,D.F.
- Garraway, M. and Evans, R. 1984 . Fungal Nutrition & Physiology. Ed. John Wiley & Sons,Inc.NY.

- Gutcho, S.J., 1974 .Microbial enzyme production. Noyes  
Data Corporation. Noyes Building, Park Ride, NJ.
- Keilin, D., and Hartree, E.F., 1948 . "Properties of  
glucose-oxidase". Biochemistry. vol 42, 221-229.
- Kusai, K., et al, 1960 . "Cristalization of glucose-  
oxidase from Penicillium amagasakiense".  
Biochemica and Biophysica Acta. vol 40, 555-557.
- Lehninger, A., 1981 . Bioquímica. 2da Edición. Ed.  
Omega. Barcelona, España.
- Lynch, M.J., et al 1972 . Métodos de laboratorio.  
2da edición. Ed. Interamericana. México 4 D.F.
- Martínez, M.A., 1985 . "Tratamiento y prevención de la  
fiebre de leche". Avances en Medicina Veterinaria.  
Ed. Agrotécnica S.A. año 1, vol 1, No. 3, Mayo.
- Mc. Vaugh, R., 1984. Flora Novo Galiciana. A descriptive  
account of the vascular plants of western México.  
Leguminosae. Vol 5. Ann Arbor. Univ. of Michigan  
Press. pp 329-331.
- Maugh, T.H., 1984 . "Semisynthetic Enzymes are new  
Catalysts". Science. vol 223, 154-156 January.
- Miranda, J.A., 1981 . Importaciones de productos químicos  
y sus materias primas de 1978-1980. Dirección  
General de Industrias. Subdirección Sectorial de  
la Industria Química. México, D.F.



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Moore, E.L., 1982. Fundamentals of the fungi. Second edition. Prentice-Hall, Inc. Cliffs, N.J.
- O'Malley, J.J., and Weaver, J.L., 1972. Biochemistry. John Wiley & Sons. New York.
- Ohlmeyer, D., 1965. U.S. Patent 2940904. "Enzymatic Process".
- Pelczar, M.J., and Reid, R.D., 1972. Microbiology. McGraw-Hill Book Company Inc. N.Y.
- Pitt, J.I., 1979. The genus Penicillium. Academic Press Inc. NY pp 633.
- Reed, G., 1969. Enzymes in food processing. Second printing. Academic Press, Inc. N.Y.
- Reichert, G.T., 1983. Industrial Enzymology. The application of enzymes in industry. The Nature Press. N.Y.
- Rhodes, A., and Fletcher, D.L., 1969. Principios de Microbiología Industrial. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Riviere, J., 1975. Les applications industrielles de la microbiologie. Collection Sciences Agronomiques. Masson et Cie editeurs. Paris, France.
- Rose, A.H., 1980. Microbial Enzymes and Bioconversions. Economic Microbiology. vol 5. Academic Press Inc. London, England.

- Rucel, R., 1956 . U.S. Patent 2744017 "Removal of sugars by enzymatic process".
- Schepartz, A.I., and Subers, M.H., 1964 . "The glucose-oxidase of honey". Biochemica and Biophysic Acta, 65006, vol 85, 228-237.
- Scopes, R.K., 1985 . Protein Purifications. Principles and practice. Third printing. Springer-Verlag. N.Y.
- Scott, D., 1975 . "Applications of glucose oxidase". Enzymes in food procesing. Chapter 19. Second printing. Academic Press Inc. N.Y.
- Scott, D., 1961 . U.S. Patent 3006815. "Heat stabilization of enzymes and method".
- Spier, R.E., and Sheldon, W.M., 1986 . "Kinetics of extraction of invertasa from autolysed bakers yeast cells". Enzyme and Microbial Technology Biotechnology. Research and Reviews. vol 8. No. 2, February.
- Staunton, A., 1970 . Bioquímica Médica. Cuarta edición Ed. Interamericana. México, D.F.
- Snoboda, B.E.P., and Hassey, V., 1965 . "Purification and properties of glucose oxidase from Aspergillus niger". The Journal of Biological Chemistry. vol 240, No. 5, May.
- Taylor, R.J., 1960 . Food Additives. John Willey & Sons. N.Y.

- Thom, C., and Raper, K.B., 1945 . A manual of Aspergilli.  
The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- Ulloa, M., and Harlin, R., 1978 . Atlas de Micología  
Básica.
- Walker, J.M., 1984 . Methods in Molecular Biology.  
Proteins.Chapter 6. Humana Press. Clifton,  
N.J. vol 1.
- Windholz, M., 1983 . The Merck Index. An Enciclopedia  
of Chemicals, Drugs and Biologicals. Rahway.  
N.J. Merck & Co. Inc.
- Zwaig, G., and Sherman, J., 1972 . Handbook of  
Chromatography. CRC Press Inc. Florida, Miami.  
vol 2.

## A P E N D I C E

### TABLA DE ABBREVIACIONES.

|                |                                                              |
|----------------|--------------------------------------------------------------|
| A              | Absorbancia                                                  |
| ATCC           | American Type Cultures Collection                            |
| BSA            | Albúmina de Suero Bovino                                     |
| °C             | Grados Centígrados                                           |
| Δ              | Delta, Diferencia                                            |
| D              | Constante dieléctrica                                        |
| FAD            | Flavín Adení Dinucleótido                                    |
| GD             | Glucosa Oxidasa                                              |
| K <sub>m</sub> | Constante de Michaelis-Menten                                |
| M              | Molar                                                        |
| mm             | milimolar                                                    |
| nm             | nanómetro                                                    |
| PDA            | Papa Dextrosa Agar                                           |
| pp             | precipitación                                                |
| U              | Unidades por miligramo de proteína (actividad<br>especifica) |
| tz             | trazas                                                       |
| rpm            | revoluciones por minuto                                      |
| SDS            | Sodacil Sulfato de Sodio                                     |
| Tween 20       | Polioxitilene-sorbitol-monoaurato                            |
| uv             | Ultravioleta                                                 |
| vis            | visible                                                      |
| w/v            | Peso/volumen                                                 |