

242



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



**ESTUDIO BIBLIOGRAFICO SOBRE LA
EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA ENZIMA
GLUCOSA OXIDASA OBTENIDA A PARTIR DEL
HONGO Aspergillus niger**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A N :
LETICIA FRAUSTO RUIZ
MA. EUGENIA RAMOS MORALES**

DIRECTORES: Q.F.B. PATRICIA MIRANDA CASTRO

I.B.Q. JOSE FRANCISCO MONTIEL SOSA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA ACADÉMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 29 del Reglamento General de Exámenes, se
permítanos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Estudio bibliográfico sobre la extracción y purificación de la
enzima glucosa oxidasa obtenida a partir del hongo Aspergillus
niger.

que presenta la pasante: Jeticia Frausto Ruiz
con número de cuenta: 8418845-2 para obtener el TÍTULO de:
Ingeniera en Alimentos ; en colaboración con :
María Eugenia Ramos Morales

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para
ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos
nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 31 de Mayo de 1994.

FRESENTE	<u>I.B.O. J. Francisco Montiel Sosa</u>
VOCAL	<u>M. en C. Clara Ines Alvares Manrique</u>
SECRETARIO	<u>O.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Ruben Darío Moreno Terrazas</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>O.F.B. Carolina Moreno Ramos</u>



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ACORDO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Estudio bibliográfico sobre la extracción y purificación de la
enzima glucosa oxidasa obtenida a partir del hongo Aspergillus
niger.

que presenta la pasante: Maria Eugenia Ramos Morales
con número de cuenta: 8335450-4 para obtener el TÍTULO de:
Ingeniera en Alimentos ; en colaboración con :
Leticia Frausto Ruiz

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR ME RATA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 31 de Mayo de 1991

PRESIDENTE L.E.O. J. Francisco Montiel Sosa
VOCAI M. en C. Clara Ines Alvarez Manrique
SECRETARIO O.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda
PRIMER SUPLENTE M. en C. Ruben Dario Moreno Ferrazas
SEGUNDO SUPLENTE O.F.B. Carolina Moreno Ramos

Agradecemos a los directores de tesis IBQ. José Francisco Montiel Sosa y QFB. Patricia Miranda Castro por sus acertadas sugerencias y observaciones.

Agradecemos a los integrantes del jurado por sus valiosas sugerencias a la presente tesis : M.C. Clara Inés Alvarez y QFB. Ma. Esther Revuelta.

Agradecemos a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por brindarnos la oportunidad de estudiar en la máxima casa de estudios.

Agradecemos la valiosa ayuda brindada por la Sra. Andrea, Sra. Irene y al señor Raymundo, durante la realización de esta tesis.

Así como todas aquellas personas que participaron directa e indirectamente en la realización de esta tesis.

DEDICATORIAS

Leticia Frausto Ruiz.

Especialmente a Dios por darme la dicha de existir.

A mis padres : Catarino Frausto y Lidia Ruiz, que gracias a ellos he realizado una de mis metas y a quienes ofresco esta tesis.

A mis hermanos : Rosalba, Israel Jesús y especialmente a Isaías que con su apoyo contribuyó a la realización de este trabajo.

A mi Tía : Ma. del Refugio Ruiz que desde temprana edad supo sembrar en mí el hábito del estudio.

A mis Tíos (as): Hermelinda Frausto, Juana Torres, Arturo Martínez y Francisco Ruiz por su apoyo y cariño.

A mi abuelita : Lorenza Torres por sus consejos y cariño.

A mis amigas inseparables : Patricia López, Elvia Claudia Pulido, Irma Vargas por compartir las tristezas y alegrías.

A mis amigos (as) de la facultad : Guadalupe Sánchez, Lorena Castrejón, Ma. Eugenia Ramos, Jerónimo López, Marco Antonio Lozoya y David Trejo por su amistad.

A Martín Valdez : Por su amor y comprensión a lo largo de toda la carrera.

Ma. Eugenia Ramos Morales.

A la memoria de mi Madre : Ma. del Refugio Morales, por todos los momentos que compartimos, por el apoyo, consejos y cariño que me diste.

A mi Padre : Alberto Ramos Gómez , gracias por tu confianza, apoyo y cariño que me han ayudado alcanzar las metas más importantes de mi vida.

A mi hermana Patricia : Gracias por apoyarme a lo largo de la carrera y en los momentos más difíciles de mi vida.

A mi Tio Guillermo Ramos : Gracias por tu apoyo y comprensión.

A mi Tia Virgilia Morales : Por tus consejos y cariño.

A Hector Fuentes : Por tu cariño y comprensión.

A mi amigo J.C. T. L. : Por tu valiosa participación en la realización de este trabajo .

A mis amigas : Alejandra Rivera, Berenice Díaz, Catalina Dominguez ,Leticia Frausto.

A la maestra MVZ. Rosa Maria Ramos por su valiosa ayuda.

INDICE

	Página
Introducción	11
Objetivos.	12
Resumen.	13
C a p í t u l o .	
1.Generalidades de enzimas.	14
2.Propiedades generales de la glucosa oxidasa.	21
3.Caracteísticas generales del <u>Aspergillus niger</u> y sus medios de cultivo.	42
4.Técnicas de ruptura celular para la extracción de la enzima glucosa oxidasa.	59
a) Prensa francesa.	63
b) Molienda con un abrasivo.	64
c) Ultrasonicación.	66
5.Técnicas de purificación de la glucosa oxidasa.	69
a) Precipitación con acetona y ácido tánico.	83
b) Precipitación con sulfato de amonio.	84
c) Precipitación con alcohol, diálisis, sulfato de amonio, y cromatografía en DEAE - celulosa.	85
d) Precipitación con ácido tánico, acetona y cromatografía.	88
e) Cromatografía en una columna de Sepharosa y Sulfetil (SE), Sephadex C-50.	89
f) Purificación, diálisis, cromatografía en Amberlite ,precipitación y cromatografía en columna de DEAE- celulosa.	91

6. Métodos para medir la actividad enzimática	96
a) Manométrico	99
b) Titulación	99
c) Solución sin amortiguar	100
d) Conductividad	100
e) Colorimétrico	100
7. Metodología a seguir para la fermentación, extracción, purificación y análisis de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa	104
8. Conclusiones	109
9. Anexos	113
10. Bibliografía	123

INDICE DE TABLAS .

Tabla.	Página
1. Areas de aplicación y potencial de la tecnología enzimática.	17
2. Principales grupos enzimáticos con aplicación industrial.	18
3. Requerimiento de pureza.	25
4. Resumen de aplicaciones de la glucosa oxidasa.	28
5. Aceptores de hidrógeno para la glucosa oxidasa.	32
6. Velocidades de reacción de la glucosa oxidasa.	40
7. Resumen de las constantes cinéticas para la oxidación de glucosa oxidasa.	41
8. Composición de aminoácidos de la glucosa oxidasa.	45
9. Estabilidad de la glucosa oxidasa por <u>Aspergillus niger</u> .	46
10. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la glucosa de <u>Aspergillus niger</u> .	46
11. Acción de la glucosa oxidasa sobre los azúcares.	47
12. Determinación del peso molecular de la glucosa oxidasa del <u>Aspergillus niger</u> .	48
13. Producción de glucosa oxidasa reportada en la patente No. 3,701, 715, 1972.	55
14. Actividad de glucosa oxidasa obtenida por diferentes medios de cultivo.	57
15. Comparación de actividad y porcentaje de recuperación por el método de molienda con un abrasivo.	66
16. Comparación de la actividad (U/ml) por tres métodos de extracción.	68

17. Efecto del número de etapas de purificación en la producción y costo de un proceso común.	71
18. Propiedades de los geles de Sephadex.	77
19. Actividad específica de glucosa oxidasa obtenida después de cada etapa de purificación reportada en la técnica 5.15.3.	87
20. Actividad y recuperación de glucosa oxidasa durante el proceso de purificación reportada en la técnica 5.15.6.	93
21. Actividad específica de glucosa oxidasa reportadas en las técnicas de purificación 5.15.3, 5.15.4, 5.15.5 y 5.15.6.	95
22. Métodos directos o indirectos para medir la actividad enzimática.	98

INDICE DE FIGURAS

Figura.	Página
1. Gráfica .Efecto del pH en la velocidad de oxidación de D-glucosa por glucosa oxidasa.	33
2. Mecanismo de reacción de la glucosa oxidasa.	38
3. Diagrama de flujo para la separación de enzimas.	62
4. Gráfica. Porcentaje de purificación por etapas.	71

SIMBOLOS

E_{ox} :	Enzima oxidada
E_{red} :	Enzima reducida
E_{redP1} :	Enzima gluconolactona reducida
E_{oxdP2} :	Enzima peróxido de hidrógeno oxidada
EFAD:	Enzima flavina adenina dinucleótido oxidada
EFADH ₂ :	Enzima flavina adenina dinucleótido reducida
FDA:	Food and Drug Administration
G:	Glucosa
G.O:	Glucosa oxidasa
GRAS:	Generally recognized as Safe
K:	Constante de velocidad de reacción
K_a :	Constante de disociación
K_m :	Concentración de sustrato
K_{eq} :	Concentración de la glucosa
K_{O_2} :	Concentración del oxígeno
K_{kat} :	Número de recambio
mM:	Milimolar
μ M:	Micromolar
M:	Molar
MKC:	Miles Kali Chemie (Fabricante)
nm:	nanómetro
PM:	Peso molecular
Q_{10} :	Coficiente de temperatura (°C)
Q_{O_2} :	Microlitros de oxígeno absorbidos/mg (peso seco)/hr
Vmax:	Velocidad máxima
U/mg:	glucosa producida por μ M de peróxido de hidrógeno/min
U:	Unidad internacional, cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1μ M de sustrato/min

INTRODUCCION

El uso de enzimas en la industria es una de las aplicaciones de la biotecnología que presenta un rápido desarrollo tecnológico principalmente en el campo de la industria alimentaria y farmacéutica, y que a largo plazo tendrá repercusiones muy importantes en la industria química (petróleo, hule y plástico).

En México, la importancia de las enzimas para cualquiera de las ramas resulta muy costoso, por lo que, el desarrollo de tecnologías basadas en estos productos implica un riesgo de dependencia externa cada vez mayor.

Por esta razón es necesario la generación de tecnología propia así como la búsqueda de fuentes de obtención de enzimas. Una de las fuentes de obtención potencial de enzimas son los microorganismos, algunos de los cuales segregan la enzima por lo que no requieren de ruptura celular. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el costo de obtención de las enzimas y su actividad depende de la buena elección del método de extracción y purificación.

Por otra parte, los microorganismos son capaces de desarrollarse fácil y rápidamente en su medio de cultivo y la tecnología al respecto, a gran escala, se encuentra bien establecida.

OBJETIVO GENERAL

ESTABLECER LA METODOLOGIA MAS ADECUADA PARA LA EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA OBTENIDA A PARTIR DEL HONGO Aspergillus niger.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. ESTUDIO BIBLIOGRAFICO DEL Aspergillus niger COMO PRODUCTOR DE GLUCOSA OXIDASA.
2. ESTUDIO BIBLIOGRAFICO SOBRE LOS METODOS DE EXTRACCION, PURIFICACION , Y MEDICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GLUCOSA OXIDASA .
3. SELECCION DE LA METODOLOGIA DE EXTRACCION ,PURIFICACION Y EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GLUCOSA OXIDASA.

Resumen.

El presente trabajo se enfocó en la recopilación bibliográfica sobre la enzima glucosa oxidasa obtenida a partir del Aspergillus niger, su extracción, purificación así como las técnicas para medir la actividad enzimática y cuantificación de proteína.

Existen varias fuentes de obtención de esta enzima, siendo este hongo un buen productor con altos rendimientos, fácil manejo y por ser considerado por la FDA como GRAS (del inglés Generally Recognized as Safe), que puede ser utilizado sin riesgos en los alimentos y sin peligro para la salud del consumidor.

Se revisó y comparó diferentes medios de cultivo para la producción de la enzima por Aspergillus niger, encontrándose diferencias en la fuente de carbono, nitrógeno, minerales y otros, así como la actividad enzimática (U/g) reportadas.

Una vez producida la enzima es necesario romper el micelio por alguno de los métodos reportados (prensa francesa, sonicación y molienda con arena), observándose diferencias significativas en cuanto a la actividad (U/g). Utilizándose este mismo parámetro para la purificación de la enzima.

Para la purificación se analizaron diferentes técnicas, las cuales emplean una combinación de varios métodos de purificación. Es importante que tanto el método de extracción como de purificación no desnaturalizen la enzima.

Finalmente se propone el método para la medición de actividad enzimática y cuantificación de proteína.

CAPITULO I

GENERALIDADES

DE

ENZIMAS

1. GENERALIDADES DE ENZIMAS

Los procesos biológicos se llevan a cabo en gran medida por reacciones catalizadas por proteínas que son moléculas de gran tamaño, complejidad y realizan funciones biocatalizadoras (hormonas y enzimas, estas últimas pueden presentar estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria) de reacciones químicas, y están estructuradas por los aminoácidos.

Las enzimas debido a su gran poder catalítico a las bajas energías de activación permanecen *a c t i v a s* a temperaturas de subcongelación y por ello hay riesgo de que sean importantes estimuladores de reacciones de degradación en alimentos refrigerados o congelados, así como instrumentos primarios para expresar la acción de los genes. [46]

Dependiendo del tipo de acción catalítica que ejerce la enzima puede clasificarse en los siguientes grupos:

1. Oxido reductasas.
2. Transferasas
3. Hidrolasas
4. Liasas
5. Isomerasas
6. Ligasas

[13,14,31,32,33]

El grupo más amplio de enzimas utilizadas en la elaboración de alimentos es el de las hidrolasas. Se usan algunas oxido reductasas e isomerasas, pero escasamente las transferasas, ligasas y liasas. [10,26,28,38,39,41]

Además de su poder catalítico las enzimas presentan las siguientes características :

1. Son muy específicas.
2. La velocidad de reacción es de dos a tres órdenes de magnitud mayor que la de los catalizadores inorgánicos.
3. Las condiciones de reacción, temperatura baja , presión hace que su uso sea poco costoso .
4. Se pueden producir fácilmente y en gran escala mediante técnicas de ingeniería genética.
5. Se reutilizan mediante técnicas de inmovilización.
6. Se pueden realizar reacciones de síntesis en varios pasos.
7. Se puede efectuar reacciones en posiciones de la molécula que ordinariamente no se llevan a cabo porque están insuficientemente activadas. [31]

De estas características la especificidad de las enzimas es lo que las distingue de los catalizadores no biológicos. La especificidad de las enzimas es muy importante en la elaboración de alimentos, donde a menudo interesa modificar un sólo componente durante ella . La precisión de los métodos enzimáticos depende de la especificidad. [13]

Hoy en día es importante reconocer que la tecnología enzimática es un camino viable para solucionar los problemas básicos del hombre como por ejemplo:

- Reutilización de los desperdicios industriales
- Uso de materiales de bajo precio en producción.
- Disminución de la dependencia del petróleo en la industria química
- Uso más eficiente de recursos.
- Disminución en el consumo de agua en la industria química.
- Sustitución de la fermentación por procesos enzimáticos.
- Uso de enzimas como catalizadores en la industria química.
- Disminución en el número de unidades de proceso.
- Aumento de la vida de operación del equipo.
- Reducción de mano de obra.
- Desarrollo de nuevos productos y procesos.
- Mejorar la calidad de los productos.
- Progreso en la terapia de las enfermedades congénitas. [31,35]

Tabla.1 Areas de aplicación presentes y potencial de la tecnología enzimática.

Agricultura	Fijación de nitrógeno. Biodegradación.
Química	Síntesis orgánica Petroquímica.
Energía	Conversión de celulosa.
Alimentos	Utilización de alimentos Alimentos.
Productos farmacéuticos	Antibióticos Enzimoterapia

Tabla 2. Principales grupos enzimáticos con aplicación industrial .

Clase de enzima	Acción que efectúa
Proteasas	Hidrolizan proteínas
Amilasas	Hidrolizan almidones
Celulasas	Hidrolizan celulosas, hemicelulosa, pectinas, β -glucona.
Isomerasas	Rearreglan moléculas con- virtiéndola en sus isómeros
Lipasas y Fosfolipasas	Hidrolizan aceites y grasas.
Oxido reductasas	Reducción u oxidación de mo- léculas.

[31]

Sólo algunas enzimas presentan riesgos, a causa de su actividad catalítica, aún en el manejo de circunstancias normales estas son áreas de alto peligro potencial, desde su origen y naturaleza química. En relación a su actividad tóxica, actividad microbiológica residual y toxicidad química.

Todas las enzimas existen como proteínas, y tienen efectos potentes si no son manejadas correctamente y si se inhalan en polvo o se tiene contacto pueden causar una respuesta inmune ,alergias y problemas respiratorios. El problema se soluciona encapsulando y preparando la enzima en forma granulada en seco. El productor debe proporcionar seguridad en el manejo de las preparaciones de enzimas.

No todas las enzimas son tóxicas, mutágenicas ni cancerígenas debido a que son proteínas. Sin embargo, las preparaciones de las enzimas no pueden ser consideradas como complementos de seguridad, ya que muchas pueden estar como contaminantes de derivados de la fuente de enzimas o producidas durante su procesamiento o almacenamiento.

Los microorganismos usados en la producción de enzimas pueden ser de una fuente peligrosa y por lo tanto son focos de atención.

Algunos de los problemas asociados con el uso independiente de enzimas es posible dominarlo usando la inmovilización de enzimas. [13]

Tomando como referencia que en Estados Unidos las enzimas para ser consideradas como seguras por la FDA (Food and Drug Administration), y poder ser usadas como ingredientes en alimentos, se dividieron a las enzimas en cinco clases:

- * Grupo A. Sustancias que se sugieren que son aceptables en el uso de alimentos.
- ** Grupo B. Sustancias que se tiene prueba disponible y que pueden ser consideradas provisionalmente aceptables para el uso en alimentos, pero falta información para que sean disponibles dentro de un intervalo de tiempo para su revisión.
- Grupo C. Sustancias con evidencia viable que sugiere toxicidad y no puede ser permitido para el uso en alimentos, hasta tener una evidencia adecuada de su seguridad y puede ser prevenida hasta su estabilidad y aceptabilidad.

Grupo D. Sustancias con información disponible indicando en definitiva o probable toxicidad no puede permitirse su uso en alimentos .

Grupo E. No se cuenta con información suficiente sobre la toxicidad de las sustancias, por lo que no se tiene una opinión acertada sobre su uso en alimentos .

[13]

Esta clasificación toma en cuenta su potencial químico tóxico de los microorganismos y sus metabolitos secundarios tales como micotoxinas y aflatoxinas. El desarrollo de los conocimientos acerca de las sustancias y sus efectos a largo plazo, es una de las razones de los controles legislativos.

*Son exclusivamente de plantas y animales, por ejemplo, papaina, catalasa, lipasa, renina y otras proteasas.

**Contiene un amplio rango de enzimas de origen microbiano y pueden ser usadas en el procesamiento de alimentos.

[13]

Los principales factores que afectan la actividad enzimática son : pH, temperatura, humedad, fuerza iónica, radiación ionizante, distorsión, presión y efecto de interfase. [1,59,64]

Finalmente en la actualidad se utilizan disolventes orgánicos y compuestos hidrofóbicos por su habilidad de manejar el equilibrio termodinámico de la reacción, además de los cambios químicos y estructurales los cuales provocan un incremento en la estabilidad, además de que causan inactivación térmica irreversible de las enzimas. [13,32]

CAPITULO 2

PROPIEDADES GENERALES DE LA

GLUCOSA OXIDASA

2. GLUCOSA OXIDASA

La glucosa oxidasa (β -D-glucosa oxido reductasa E.C.1.1.3.4) es la enzima más utilizada como antioxidante para prevenir cambios en el color, aroma y sabor de los alimentos durante su proceso , transporte , y almacenamiento, además de ejercer una acción antibiótica.

En 1928 Muller descubrió la presencia se glucosa oxidasa en cultivos de los hongos Aspergillus niger y Penicillium glaucum, también se ha encontrado en otros cultivos como :

[2,6,21,34,49,
51,69,73]

Penicillium anatalicum
Penicillium amagasakiense
Penicillium brunneum
Penicillium chrysogenum
Penicillium diversum
Penicillium egyptiacum
Penicillium funiculosum
Penicillium notatum
Penicillium paxilli
Penicillium purpurogenum
Penicillium vitale
Penicillium senticosum
Aspergillus oryzae

Pero no se encuentra en plantas superiores ni animales.

[45;51,65,69,79]

Entre los principales productores de glucosa oxidasa se encuentran los hongos P.amagakiense, P.notatum, P.purpurogenum y Aspergillus niger.

El P.purpurogenum produce una toxina llamada B.rubrotoxina la cual tiene una dosis letal de 0.25 mg/kg esta toxina daña al DNA y RNA, por lo que no se recomienda este microorganismo para la producción de glucosa oxidasa. El P.notatum tiene una acumulación máxima de enzima a los 14 días, después de este tiempo el medio se vuelve alcalino y la enzima desaparece de la solución.

El Aspergillus niger es el principal productor de glucosa oxidasa, por no ser patógeno al hombre y no producir toxinas. Por lo tanto es la fuente de obtención más empleada.

La glucosa oxidasa es una deshidrogenasa capaz de utilizar ciertos colorantes como aceptores de hidrógeno o de oxígeno molecular, sin la necesidad de intermediarios. Es por eso que es llamada aerodeshidrogenasa, sin embargo la glucosa deshidrogenasa de organismos vivos no son glucosa aerodeshidrogenasa. [69]

La glucosa oxidasa es una flavoproteína que contiene dos moles de flavin adenina dinucleótido (FAD) grupo prostético por mol de enzima, además contiene 16% de carbohidratos (manosa, galactosa y glucosamina en forma N-acetil), por otra parte las cadenas de carbohidratos no están involucrados directamente con la catálisis.

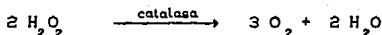
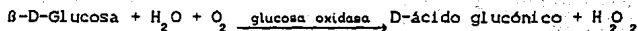
[20,42,44,51,69,76,82,85]

La glucosa oxidasa puede ser disociada en dos subunidades por rompimiento de dos puentes disulfuro por mercaptoetanol y con un tratamiento SDS, cada subunidad de polipéptido contiene un átomo de Fe^{2+} . [51]

La especificidad de la glucosa oxidasa es muy alta para la forma β de la glucosa que es oxidada 160 veces más rápido que la forma α y de otros sustratos como el 2-Desoxi-D-glucosa y 6-Desoxi-D-glucosa son oxidados a razón del 10% menos que la forma β -D-glucosa.

[51,69]

La reacción que cataliza es:



[8,9,12,39,51,60]

El peróxido de hidrógeno es un efectivo bactericida y puede removerse después de su uso por tratamiento con catalasa. Para aplicaciones a gran escala, las dos actividades enzimáticas no son separadas glucosa oxidasa y catalasa pueden ser usadas juntas cuando la producción de peróxido de hidrógeno debe ser eliminado. [13]

Sin embargo, en muchas aplicaciones la glucosa oxidasa es utilizada para generar peróxido de hidrógeno para cuantificar el sustrato glucosa. Cuando la catalasa está presente el peróxido de hidrógeno es destruido esto hace el análisis poco exacto o incluso inefectivo. [9]

Es importante hacer notar que la enzima glucosa oxidasa es relativamente cara, por lo que puede ser beneficioso emplearla en forma inmovilizada. [1]

Aplicaciones de la glucosa oxidasa

Para una enzima específica como la glucosa oxidasa podría pensarse que no son muchas las aplicaciones en las que puede emplearse. Las aplicaciones que se han encontrado son numerosas, variadas, inusuales, y en pocos casos increíbles. [69]

Las preparaciones de glucosa oxidasa para uso en alimentos son generalmente estandarizadas a 750 o 1500 unidades por mililitro, en forma líquida o a 1500 unidades por gramo si es en forma seca. [69]

El requerimiento de pureza de la glucosa oxidasa para su empleo se describe en la tabla 3.

Tabla 3. Requerimiento de pureza .

Actividad ≥ 200 U/mg de sustancia (25°) .
Contaminantes (relativo a la actividad específica de glucosa oxidasa) ≤ 0.01 % amilasa y sacarosa, 10 U de catalasa /mg . Para preparaciones poco puras, satisfacen los requerimientos, con una actividad de catalasa de 20 U/mg (25°) y 0.1 % amilasa y sacarosa.

[4,69]

Dependiendo del proceso de purificación, las preparaciones comerciales contienen cantidades de enzimas contaminantes como son : catalasa, invertasa, mutarasa, gluconolactonasa y glucoamilasa. [51]

La enzima puede usarse para cuatro fines:

1. Formar peróxido de hidrógeno.
2. Formar ácido glucónico.
3. Para remover glucosa.
4. Para remover oxígeno. [69]

Consideremos algunas aplicaciones :

1. Como formador de peróxido de hidrógeno, con los siguientes fines :

- a) Como bactericida que puede removerse después de su uso con catalasa .
- b) Para formar oxígeno en presencia de catalasa.
- c) En conjunto con un sistema secundario para el peróxido (ejemplo, peroxidasa y cromógeno) como una prueba de glucosa.
- d) En el tratamiento de harina, mediante la formación de peróxido con glucosa oxidasa libre de catalasa.

2. Para formar ácido glucónico y sales como medio de obtención de sales de alta pureza.

3. Para remover la glucosa.

- a) En el análisis de mezclas de azúcar, mediante la determinación del poder reductor antes y después de la eliminación de glucosa.
- b) Prueba de tolerancia de la galactosa.
- c) Para prevenir oscurecimiento de Maillard en huevos, carnes seca y papa.

4. Para remover oxígeno.

- a) Estabilización contra los efectos deteriorativos de la luz como en jugos cítricos, en el fondo de refrescos.
- b) Determinación de glucosa en un sistema cerrado por la medición polarográfica del oxígeno residual.
- c) Para remover oxígeno atrapado en emulsiones aceite- agua previniendo el desarrollo de la rancidez.

- d) Para prevenir oxidación de cerveza antes del envasado.
- e) Para prevenir que el vino vaya a formar vinagre.
- f) Para prevenir el obscurecimiento enzimático de frutas frescas congeladas, incluyendo las cerezas y duraznos.
- g) Para prolongar la vida de anaquel del semen de vacunos.
- h) Para evitar la corrosión de latas y en refrescos.
- i) Para costear las preparaciones de vitaminas solubles de ácido ascórbico y cianocobalamina (B_{12}) . [69]

5. Miscelaneos.

- a) En goma de mascar, cuando la enzima se encuentra como componente activo.
- b) Para seguir el curso de reacciones glucogénicas, como varias enzimas incluyendo maltasa, invertasa, lactasa, fosfatasa y amilasa. [69]

En la tabla 4 se presenta un resumen de aplicaciones de la glucosa oxidasa . [33,45,56,69]

Tabla 3. Resumen de aplicaciones de la glucosa oxidasa

Formar H_2O_2	Formar ácido gluconico
Maduración de harina. Como agente bactericida. Para formar oxígeno en presencia de catalasa. Como agente terapéutico.	En el cuajado de leche. En la producción de tónicos con alto contenido de azúcares (fructosa-glucosa) En la industria textil por su acción como secuestrador iónico. Para aumentar el rendimiento de los pozos profundos perforados en terrenos calcáreos. Para remover los sedimentos de leche, cerveza, etc. Así como limpiar los envases. Para la formación de sales de alta pureza. En el curtido de cuero blanco. En la composición del cemento para aumentar su plasticidad. Se usa en detergentes, piel, accesorios fotográficos, en la industria alimentaria y farmacéutica.
Remover glucosa	Remover Oxígeno
Disminución de la glucosa en el jarabe de maíz. En la eliminación del azúcar del huevo. En la carne magra de puerco. Como uso analítico en la determinación de glucosa en la orina y sangre. En hidrólisis de almidón. Para proteger la vida de anaquel del <i>Lactobacillus</i>, en preparaciones de uso oral.	Protección de grasas animales contra la oxidación. Desoxigenación de la cerveza. En tratamiento de vino blanco. En la prevención de la decoloración de camarones. Mejoramiento de la estabilidad térmica en el llenado caliente de los alimentos. Para aumentar la vida de anaquel de los aderezos. Para proteger la cianocobalamina B_{12} y al ácido ascórbico de la oxidación. Para extender la vida de anaquel del semen del toro de la oxidación.

2.1.1. Futuras aplicaciones

La enzima es inactiva en productos secos, y la humedad adicionada causa el deterioro del alimento. Para usar la glucosa oxidasa se debe adicionar junto con glucosa, un amortiguador y puesta en una bolsa sellada, impermeable al vapor de agua pero permeable al oxígeno. La bolsa sellada consiste de una película de polietileno con 50-250 miligramos de glucosa, 50-200 miligramos de MKC glucosa oxidasa P y 5 ml de amortiguador de acetato de sodio a 1.0 M y pH 6.0. [33]

En leche en polvo y sopas deshidratadas para prevenir su deterioro por oxidación y también para otros productos tales como pasteles, panecillos y postres, etc. Estas bolsas son bastante caras y son sólo factibles para productos caros. [33]

2.1.2. Aplicaciones de la catalasa.

La catalasa es una ferroporfirina que no requiere de mayores cuidados, sin embargo, su presencia es indispensable porque debido a ésta enzima se prolonga grandemente la vida media de la glucosa oxidasa. [64]

La mezcla de la glucosa oxidasa y catalasa es usada a 165 U/mg junto con peróxido de hidrógeno (cerca del 0.1% p/p) para asegurar el suficiente oxígeno molecular que esté disponible a la acción de la catalasa. [13,50,61]

2.2. Propiedades físicas.

2.2.1. Estabilidad

La glucosa oxidasa en forma sólida es estable por 2 años a 0°C y por 8 años a -15°C, y en solución acuosa a concentraciones de 0.1% a 0.25% a 5°C por 1 semana. [2]

La enzima cristalina es estable en solución de sulfato de amonio por un tiempo prolongado a temperatura ambiente. La actividad de la enzima no se ve afectada por incubación a 39°C y pH 5.6, por 1h, y 0.2 % de dioxido de sodio, 0.2 % de dodecilsulfato de sodio, 1 % de pepsina, 1% de papaína. El tratamiento con pepsina a pH 2.5 y tripsina a pH 7.5 por 8 horas no afecta su actividad. La enzima es inestable a temperaturas arriba de 40°C. [2]

La enzima liofilizada es estable por varios meses a 4°C. La liofilización causa además una pérdida de cerca del 20% de su actividad. La actividad enzimática puede ser mejorada cerca del 30% por adición de flavina (0.1 % de peso seco). El preparado fue relativamente estable durante el primer año de almacenamiento en el refrigerador a 4°C de enzima seca, la actividad no cambió del todo y después de dos años esta decreció sólo un 10%. [1,70].

La alta pureza es obtenida por la reprecipitación de la enzima pero desafortunadamente es poco estable en condiciones más concentradas. El concentrado de glucosa oxidasa puede perder el 20% de su actividad original en un mes, almacenada a baja temperatura.

Sin embargo, el producto comercial estandarizado es razonablemente estable a temperatura ambiente en forma seca. [45]

La presencia de alcoholes polihidricos tiene efecto estabilizante sobre la glucosa oxidasa. A temperatura de congelación es muy estable, sólo pequeñas pérdidas de actividad se han encontrado con muestras de enzimas almacenadas por varios años a 3°C. En presencia de óxido de deuterio es más estable que en agua. También se encontró que en presencia de 4 M de xilitol se incrementa la vida media en un factor cercano a 25 . [51,80,82]

2.2.2. Temperatura óptima.

La temperatura óptima rara vez se menciona porque la solubilidad del oxígeno disminuye cuando se aumenta la temperatura, lo que tiende a cancelar las ventajas que representaría un aumento de la temperatura; A pesar de esto la velocidad de reacción es aproximadamente constante entre 30° y 60 °C. Esta enzima es relativamente estable en un amplio intervalo de pH y temperatura. [12,69]

2.2.3. Aceptores de hidrógeno.

Keilin y Hartree reportaron que la glucosa oxidasa podría usar 2,6-diclorofenolindofenol como aceptor de hidrógeno (además del oxígeno). Con la enzima cristalina, la velocidad de oxidación de glucosa con la presencia de 2,6-diclorofenolindofenol es sólo un 3.3% con respecto a la presencia de oxígeno. Esto se muestra en la tabla 5. [2]

Tabla 5. Aceptores de hidrógeno para glucosa oxidasa.

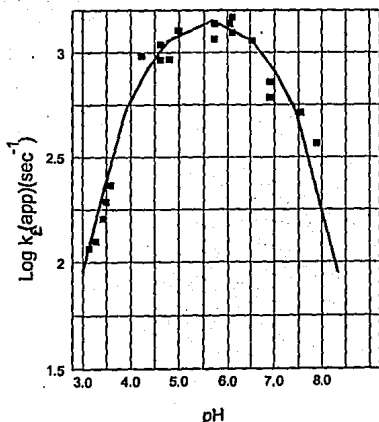
Colorante	E'_0 (Volts)	Tiempo de decoloración (min) ^a
Azul de toluleno	0.115	11
Tionina	0.062	16
Azul de metileno	0.011	75
Piocianina	-0.034	31
Safranina T	-0.289	1400

^a Resultados de Franke y Deffner en glucosa oxidasa (preparación de Muller). [2]

2.2.4. Influencia del pH.

El pH óptimo de la enzima es de 5.6, y la variación de concentración de los amortiguadores de fosfato y acetato entre 0.03 y 0.25 M no influyen en la velocidad de consumo de oxígeno. La enzima es por tanto inestable a valores de pH mayores de 8 y menores de 2, a pH 8.1, sólo cerca de un 10% de la actividad original permanece después de 10 min y el proceso de inactivación es más rápido a pH 9.1. En la gráfica 1 se muestra la influencia de la variación de pH en la velocidad de oxidación de D-glucosa por glucosa oxidasa.

A cualquier pH de 8.1 o 9.1 la presencia de glucosa ejerce una acción protectora. La oxidasa cristalina es estable a pH de 3.5 y 7.0 a 40°. [2]



Gráfica 1. Efecto del pH en la velocidad de oxidación de D-glucosa por glucosa oxidasa. [87]

2.3. Inhibidores.

La enzima no es inhibida por narcóticos (alcoholes y uretanos), HCN, H_2S o NH_3 . A concentraciones de 0.01M los siguientes porcentajes de inhibición se reportan : 8-hidroxiquinolina, 11% ; nitrato de sodio, 13 % ; semicarbazida, 20%. La enzima cristalina es completamente inhibida por 10^{-3} M de p-mercuribenzoato y parcialmente por soluciones de dimedon a 10^{-3} , fenilhidrazina, hidrazina, hidroxilamina y bisulfito de sodio.

Las inhibiciones por los reactivos carbonil aparentemente no se deben a reacciones con metales como son fierro y cobre en las preparaciones cristalinas. La actividad oxidativa es a lo más reducida sólo un 15% por la adición de muchos otros azúcares; sin embargo, D-arabinosa y 2-deoxi-D-glucosa, se han reportado que inhiben también a glucosa oxidasa del Aspergillus niger. [2,33]

La glucosa oxidasa es inhibida por el peróxido de hidrógeno que es uno de los productos formados cuando la glucosa oxidasa cataliza la reacción entre la glucosa y el oxígeno, este causa inactivación irreversible. La velocidad de desactivación depende de la velocidad de oxidación de la glucosa a diferentes niveles de concentraciones de peróxido de hidrógeno. [43] Esta velocidad puede ser descrita como una reacción de primer por orden con respecto al peróxido de hidrógeno. La desactivación es relativamente veloz con un tiempo de 5 días. Existen estabilizadores del peróxido de hidrógeno orgánicos e inorgánicos para inhibir la descomposición de este ; como son, urea, sulfato de quinona, acetanilidas, piro sulfato de sodo.

[27,43,44,62,88]

La glucosa oxidasa es inhibida por sales de metales pesados como cloruro de mercurio, plata y nitrato de plata, agentes sulfhidrilos y quelantes, mientras que la catalasa es inhibida por urea, congelación y descongelación bajo condiciones aeróbicas. [69]

Si la desnaturalización térmica es discontinua dos clases de inactivación se distinguen:

1. Una severa inactivación debido a la producción de peróxido de hidrógeno este es disminuido por catalasa y por catalisis mineral.
2. La segunda es una autoinactivación que depende del número de ciclos catalíticos transportados fuera de la enzima. [8]

3. Los narcóticos inhiben la capacidad oxidativa de la enzima, lo que concuerda con lo observado para otras deshidrogenasas y no con oxidasas. [8]

La autoinactivación puede ser en parte debido a los resultados de la reacción química de los grupos fosfatos que van junto a un FAD dando por resultado la formación de un puente entre dos aminoácidos en la parte central de la enzima [27]

También se ha encontrado que la pérdida del FAD destruye irreversiblemente la actividad de la enzima del A. niger, y sólo se restablece parcialmente con la enzima del P. amagasakiense [67]

Por otra parte la velocidad de autoinactivación tiende a reducirse cuando se sustituye oxígeno por derivados de ferroceno o crinoidal, y un aceptor de electrón final o bien introduciendo una sustancia química soluble en el proceso. [27]

La velocidad de inactivación es muy rápida a pH abajo de 4.0. La enzima es relativamente resistente al calor, está no cambia después de 60 minutos de calentamiento a 40°C, aunque a temperaturas más altas causa su rápida inactivación. Se encontró que esta velocidad en la forma reducida no depende de la concentración de D- glucosa. También se ha demostrado que el complejo enzima-sustrato es más susceptible a la autoinactivación que la enzima misma. La glucosa oxidasa atrapada es más resistente a la desnaturalización en condiciones tales como pH alcalino y temperatura de 50° - 60°C que la forma soluble de la enzima. [27,72]

Recientemente Laane y colaboradores propusieron el uso de un electrón artificial de aceptor en vez de oxígeno para eliminar el problema de inactivación por peróxido de hidrógeno. [8]

Existen enzimas tales como sacarasa, maltasa que son indeseables y al mismo tiempo con catalasa deben ser separadas o inactivadas por medio de una columna o gel de filtración u otros métodos. [33]

2.4. Mecanismo de acción y cinética de la glucosa oxidasa.

En 1948 se descubrió que la glucosa oxidasa, no oxida a la β -D-glucosa por la combinación directa de oxígeno molecular con la β -D-glucosa. Las siguientes observaciones son evidencia de esto y del mecanismo de acción:

1. La glucosa oxidasa no es inhibida por HCN y CO, indicando que no tiene un ión metálico esencial. En general las oxidasas contienen iones metálicos como cofactores esenciales.
2. Otros aceptores de hidrógeno, como la tionina, azul de metileno y quinona pueden reemplazar el requerimiento de oxígeno. La capacidad de usar tales compuestos es característico de deshidrogenasas y no de oxidasas.
3. Los narcóticos inhiben la capacidad oxidativa de la enzima, lo que concuerda con lo observado para otras deshidrogenasas y no con oxidasas.
4. La alta especificidad de la enzima es una propiedad general de deshidrogenasas y no de oxidasas.
5. Hay una correlación directa entre el contenido de riboflavina y la actividad enzimática. Si se elimina el FAD se pierde completamente la actividad, la que puede ser restituida con la adición de FAD.

6. La glucosa oxidasa en su forma oxidada tiene un máximo de absorbancia de 280 nm, típica de todas las proteínas y de otros máximos a 377 y 455 nm debidos al FAD. Si se adiciona glucosa en condiciones anaerobias, las absorbancias máximas en 377 y 455 nm desaparecen. Cuando se suministra oxígeno al sistema las dos absorbancias máximas reaparecen.

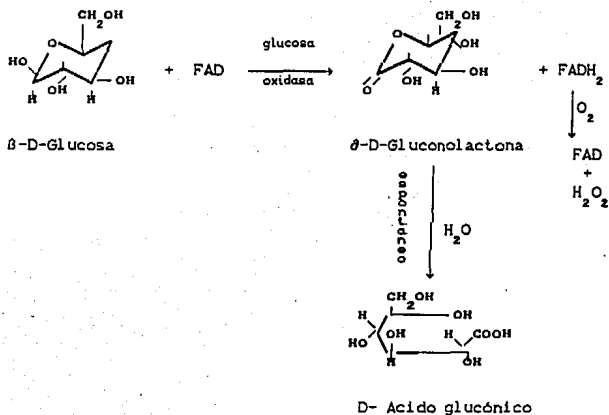
7. La glucosa oxidasa no cataliza la reacción completa bajo condiciones anaerobias y el orden de reacción depende de la concentración de oxígeno. Una evidencia del papel de oxígeno y su fuente se puede obtener con experimentos en donde se usen oxígeno y agua marcadas radiactivamente. Con el H_2O^{18} y el Oxígeno¹⁸ se encuentre en el producto final, que es el ácido D-glucónico, pero no en el peróxido de hidrógeno. Con el oxígeno¹⁸ éste se encuentra en el peróxido. [44,62,66,68]

La forma oxidada de la enzima E FAD funciona como una deshidrogenasa al extraer dos hidrógenos de la β -D-glucosa para formar la enzima reducida, E FAD H_2 y la δ -D- gluconolactona.

Además de la oxidación de D-glucosa a δ -D-gluconolactona por la enzima glucosa oxidasa ésta también ataca a 2-desoxiglucosa, D-manosa, D-galactosa y D-xilosa, aunque la conversión de estos azúcares es muy lenta. [1,66]

En un paso subsecuente la δ -D- gluconolactona se hidroliza enzimáticamente, a ácido D-glucónico y la enzima reducida es reoxidada enzimáticamente por oxígeno molecular .

La subsecuente hidrólisis de δ -gluconolactona es la reacción espontánea que se muestra a continuación en la figura 2 :



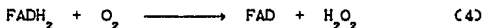
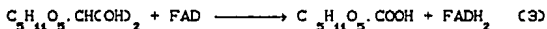
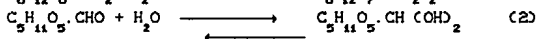
[2,66,69]

Figura 2. Mecanismo de reacción de la glucosa oxidasa.

Cuando la glucosa oxidasa cataliza la reacción es una reacción de segundo orden . Pero en la enzima comercial se usa bajo condiciones en las cuales uno de los reactantes tiene la constante de actividad, entonces la reacción es de primer orden. [89]

2.4.1. Acción de la enzima como una deshidrogenasa

Muller originalmente clasificó la enzima como una oxidasa, asumiendo que la enzima es "activada" por oxígeno molecular. Franke y Lorenz adujeron que la enzima era una deshidrogenasa, quizás remueve hidrógeno de glucosa de la forma hidratada de glucosa aldehído como se muestra en las siguientes ecuaciones, (1,2,3 y 4) .El mecanismo esencial de glucosa oxidasa fué mostrado por rastreo.



Observaciones polarométricas mostraron que el producto primario de la reacción de glucosa oxidasa fué *d*-gluconolactona. [2]

2.4.2. Cinética.

Los datos que se reportan a continuación son el resultado de la experimentación con glucosa oxidasa de *A.niger* . (ver referencia 66).

1.La glucosa reacciona mucho más rápido que los azúcares (2-desoxiglucosa, manosa, galactosa y xilosa), V_{max} a $0^\circ = 240 \text{ seg}^{-1}$;
 $Km_{glucosa} = 0.11M$, $Km_o = 2 \times 10^{-4} M$.

2. Las velocidades de reacción de enzima oxidada por azúcares bajo condiciones anaeróbicas se muestra en la tabla 6 :

Tabla 6. Velocidades de reacción de la glucosa oxidasa.

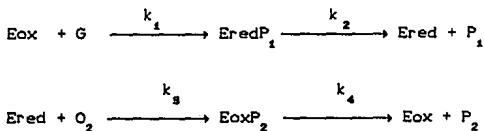
Azúcar	$M^{-1} \text{ seg}^{-1}$
Glucosa	1×10^4
Manosa	22
Galactosa	8
Xilosa	3

[66]

Las velocidades de reacción son directamente proporcional a altas concentraciones de azúcar.

3. La velocidad de reacción de la enzima con oxígeno es $1.4 \times 10^6 M^{-1} \text{seg}^{-1}$. [66]

4. Un esquema de rápido análisis espectrofotométrico de la reacción final es dada. La oxidación de glucosa está descrita por el esquema :



Donde :

P_1 = Gluconolactona

P_2 = H_2O_2

G = Glucosa

[2,36,62,66]

Las etapas 2 y 4 son de primer orden y contribuyen a observar la velocidad límite a concentración infinita de sustrato. [86]

5. En la tabla 7 se muestra las constantes cinéticas a diferentes condiciones de pH y Temperatura.

Tabla 7. Resumen de las constantes cinéticas para la oxidación de glucosa oxidasa.

Fuente microbiana	pH	T (°C)	K_{kat} (seg ⁻¹)	$K_m O_2$ (10 ⁻⁴ M)	K_m glucosa (M)
A. niger	5.6	27	1150	4.8	0.11
"	5.55	25	1440	8.2	0.11
"	5.6	30	1433	5.37	0.0802
"	4.95	25	977	5.01	0.108 ^a
"	5.2	30	1308	114.8	0.0217
* "	5.55	25	1152	5.63	0.0823

Donde: ^a originalmente representa el valor de $K_m^a = 0.0683M$ relativo a la forma β concentrado puede ser recalculado la concentración total de azúcar con el uso de la constante de equilibrio K. [80]

* Nota. Estos valores están reportados solo para la referencia [80] y los demás son específicos de otros trabajos experimentales.

CAPITULO 3

CARACTERISTICAS GENERALES DEL Aspergillus niger

Y SUS MEDIOS DE CULTIVO.

3. ASPERGILLUS NIGER

La familia Aspergillaceae está compuesto de aproximadamente de 80 especies, la mayoría de los Deuteromycetes, sin embargo, algunos presentan un estado de perfectos ascosporados.

Van Tieghem en 1867 desarrolló al Aspergillus niger en medios de cultivos ordinarios como agar Sabouraud y papa dextrosa (PDA), a 28°C. Nunca deben sembrarse en medios con antibióticos, porque las especies de Aspergillus se inhiben con la cicloheximida, ya que estos hongos son contaminantes del medio ambiente e inclusive de vías respiratorias, piel y conducto auditivo externo.

Las colonias se desarrollan rápidamente y posteriormente se transforman en colonias planas, granulosas, negras e ilimitadas, al reverso no presentan pigmentos. Al microscopio se observan hifas tabicadas de 2 a 4 micras de diámetro (de nutrición) e hifas cenocíticas más anchas de 4 a 8 micras (de reproducción), estas terminan con las clásicas cabezas aspergiliares que miden en total de 80 a 100 micras de diámetro, están compuestas por conidióforos, cenocíticos largos (100 a 200 micras) vesículas redondas (10 a 25 micras de diámetro) de donde nacen dos series de esterigmas son más grandes (8 a 10 micras) y los segundos (5 a 7 micras), de estas nacen microconidias redondas o elípticas de 2 a 3 micras. [7,87]

Aspergillus niger es uno de los Aspergillus más fáciles de identificar con su micelio blanco o amarillo que después lleva conidios negros. Esta especie se encuentra en forma muy común en Aspergilomas y es el agente que se halla con más frecuencia en la otomicosis, se ha encontrado en infecciones diseminadas .

[28,29,30,37,41,57,63,87]

La enzima glucosa oxidasa del Aspergillus niger es considerada una enzima intracelular, y esto fue apoyado por estudios citoquímicos realizados por Van Dijken y Veenhuis (1980) quienes concluyeron que la enzima estaba localizada en peroxisomas, por lo que se disminuyen las contaminaciones por otras enzimas y metabolitos que el microorganismo excreta al medio, a la vez ésta sirve como fuente de energía, además detenergran estabilidad y habilidad para acumular varios ácidos orgánicos como: ácido cítrico, glucónico y oxálico.

[15,40,51,52,55]

Algunas de las propiedades importantes de la glucosa oxidasa obtenida del Aspergillus niger se muestran a continuación:

3.1. Composición de aminoácidos

3.2. Estabilidad

3.3. Efecto de la temperatura

3.4. Acción de la glucosa oxidasa sobre diferentes azúcares

3.5. Peso molecular

3.1. La composición de aminoácidos de la glucosa oxidasa purificada del Aspergillus niger, fue determinada por Hayashi y Nakamura (1981):

Tabla 8. Composición de aminoácidos de la glucosa oxidasa.

Aminoácidos
Lisina
Histidina
Arginina
Acido aspártico
Treonina
Serina
Acido glutámico
Prolina
Glicina
Alanina
Cisteína
Valina
Metionina
Isoleucina
Leucina
Tirosina
Fenilalanina
Triptófano

La glucosa oxidasa consiste de 583 aminoácidos. Esta secuencia es precedida por unos 22 aminoácidos extensión N- terminal.

[51]

3.2: La estabilidad de una preparación comercial de glucosa oxidasa por *A.niger* a 30°C en polvo a pH 2.6 y grageas a pH 3.2 se muestran en la tabla 9.

Tabla 9 . Estabilidad de la glucosa oxidasa por *Aspergillus niger*.

Presentación	Tiempo (hr).				
	0	24	48	72	100
Grageas	100	90	87	72	55
Polvo	100	93	88	79	66

[89]

En la tabla 9 se observa que la presentación en polvo es la que presenta mayor estabilidad respecto al tiempo.

3.3.El efecto de la temperatura se muestra a continuación.

Tabla 10. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*.

Temperatura (°C)	O ₂ captado (microlitros)	Actividad relativa	Q ₁₀
0	154	0.51	1.15
10	178	0.59	1.30
20	230	0.77	1.30
30	300	1.0	1.10
40	330	1.10	0.95
50	314	1.05	0.97
60	306	1.02	

[89]

Como se muestra en la tabla 10 al incrementarse la temperatura la actividad de glucosa oxidasa aumenta hasta un punto máximo así como su coeficiente de temperatura (Q_{10}), después empieza a decrecer lo cual se explica como una desnaturalización de la enzima. [69]

3.4. En la tabla 11 se muestra la acción de la glucosa oxidasa de A. niger, P. notatum P. amagasakiense sobre diferentes sustratos.

Tabla 11. Acción de la glucosa oxidasa sobre los azúcares^a.

Enzima derivada de :			
Sustrato	<u>A. niger</u>	<u>P. notatum</u>	<u>P. amagasakiense</u>
Glucosa	100	100	100
2-Desoxi-D glucosa	3.30	—	—
Manosa	0.90	1.0	0
Galactosa	0.55	0.14	0

[69]

^a Medido en actividad relativa

La glucosa es el sustrato donde mejor actúa la glucosa oxidasa obtenida por diferentes microorganismos.

3.5. Los resultados del peso molecular por tres diferentes métodos se resumen en la tabla 12.

Tabla 12. Determinación del peso molecular de glucosa oxidasa del Aspergillus niger.

Método	Peso molecular
Velocidad de sedimentación y difusión.	188 000
Aproximado equilibrio de sedimentación.	187 000 185 000 186 000
Peso seco y análisis de flavin	184 000

[11]

Ya se mencionó algunas de las características del A. niger como son pH, temperatura, inhibidores entre otras que se deben de tomar en cuenta para su desarrollo y por ende para el medio de cultivo. [7,15,28,29,30,37,40,41,51,52,55,57,63,66,69,80,87]

En la industria se prefiere trabajar con Aspergillus niger en cultivo sumergido, dado que este microorganismo proporciona mejores rendimientos en este tipo de cultivo. [12,54]

Existen algunas objeciones que se oponen al cultivo superficial de hongos: las células del cultivo son visiblemente de diferentes tipos y están expuestas a diferentes condiciones ambientales. La hifa aérea está lejos del caldo de cultivo y por lo tanto de los nutrientes; las células del fondo, en cambio están en contacto con los nutrientes, pero sufren en un ambiente parcialmente anaerobio. [12]

En cultivos sumergidos, el crecimiento es al menos el doble que en cultivo superficial, otra ventaja mayor es que el crecimiento es homogéneo, pues el hongo está expuesto a condiciones uniformes. La esporulación es generalmente suprimida (otro factor de homogeneidad y el cultivo con agitación tiene mucho mayor contenido de oxígeno), en cambio en cultivo superficial, la totalidad del cultivo es probablemente siempre deficiente en oxígeno. [11,12]

Los cultivos sumergidos son en general más fáciles de manejar y sufren menos contaminaciones, aún cuando el costo del equipo es mayor, el bajo costo de la mano de obra, los altos rendimientos y menor tiempo de fermentación, hacen posible la amortización de dicho equipo. [11,12]

Por las ventajas que presenta el medio de cultivo sumergido se eligió para la producción de glucosa oxidasa.

La síntesis de glucosa oxidasa depende de la composición del medio de cultivo principalmente de la fuente de carbono, nitrógeno, glucosa y sacarosa siendo estos los componentes más adecuados para su producción. [11,31]

Como fuente de carbón se puede utilizar glucosa, sacarosa y melazas. Las melazas son el jatabe residual del jugo concentrado de azúcar de caña, suelen contener del 48 - 55 % de sacarosa. Aunque las melazas contienen generalmente la mayor parte de las sustancias nutritivas necesarias para la fermentación, para suplir la deficiencia de fósforo o nitrógeno puede añadirse fosfato o sulfato de amonio o utilizar líquidos de remojo de maíz. El fosfato se puede añadir como fosfato de calcio ácido o fosfato monoamónico o fosfato solo. [11,16,81]

En presencia del ión calcio se promueve la formación de la enzima, pero se ha reportado que cuando se tiene sales de amonio se inhibe la formación de la misma. Ambos mecanismos no han sido elucidados. [23,51]

Los extractos de levadura y de carne tienen un efecto favorable ya que son una fuente de nitrógeno, péptonas y vitaminas las cuales sirven como cofactores para la producción de la enzima. [11,23,51,81]

Las sales de amonio se adicionan para dos fines que son el de proporcionar nitrógeno y como agente precipitante para la enzima. [9,11,86]

El tipo de nitrógeno adicionado se diferencia por su valor relativo en la fermentación, unos estimulan el crecimiento por ceder sustancias nutritivas y otros de gran interés ya que aumentan el rendimiento en productos finales deseados. [9,11]

En algunos casos se adiciona urea como fuente de nitrógeno a la vez que funciona como un agente estabilizante del peróxido de hidrógeno ya que al haber un exceso de este se llega a inactivar la enzima. [23,27,44,61]

Se adiciona ácido cítrico para obtener el pH óptimo requerido por el microorganismo para la producción de glucosa oxidasa, además de evitar que la reacción se dirija hacia la producción del ácido. La restricción en el abastecimiento de nitrógeno tiende a aumentar la producción de ácido cítrico. [11,55,81]

A continuación se citan los medios de cultivo y sus condiciones para la producción de glucosa oxidasa reportadas en diferentes artículos.

Medio para la esporulación de la cepa

	g %
Glucosa	3
NH_4NO_3	0.025
Péptona Inop MC7 (hidrolizado pancreático de caseína)	0.025
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.010
CaCO_3	0.400
Agar DIFCO	2.0

T = 30 °C

t = 6-7 días

[23]

Nota: En un medio sólido de esporulación como salvado o remolacha o en un medio líquido las esporas son separadas del medio de crecimiento de 5 a 10 días.

3.6.1. Medios para la producción de glucosa oxidasa

3.6.1.1. Medio de cultivo Zetelaki.

	(%)
Melazas.	10
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.8
KH_2PO_4	0.075
Extracto de levadura.	1
Extracto de malta.	1
Agua de lavado de almidón.	2
pH = 5.0	
T = 28 °C.	
t = 48 horas.	

[12,24]

3.6.1.2. Medio de cultivo Zetelk.

	(g %)
Sacarosa	5.0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.8
KH_2PO_4	0.025
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.025
Acido cítrico monohidratado	0.075
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.001
Extracto de carne	0.10

pH = 4.5
t = 18 horas

[23]

3.6.1.3. Medio de cultivo Paskova and Munk

	(%)
Glucosa	5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1
KH_2PO_4	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.0125
KCl	0.025
$\text{FeCl}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.001
Acido cítrico	0.075

pH = 4.0

T = 30°C

t = 30 hr.

[12,72]

3.6.1.4. Medio de jerzy Rogalski (utilizando una cepa

A. niger mutante)

Glucosa	8 %
CaCO_3	3.5 %

	(g/lit)
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.388
KH_2PO_4	0.188
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.156

Enriquecido con peptona tipo I

T= 30 C

t= 48 Horas

pH = 5.6

Agitación rotatorio = 220 r.p.m.

[16,72]

A continuación se muestra la composición del medio de cultivo que se reporta en la patente. Para obtener estos resultados se realizó una experimentación con cinco cepas que se obtuvieron de Culture Collection of the Northern Regional Research Laboratory U.S. Department Of agriculture Peoria III. Primeramente se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de operación y fermentación .

Después se eligió a la cepa de Aspergillus niger que presentara la mayor producción de glucosa oxidasa y actividad específica.

Posteriormente (Krishnaier, lakshminarayanan) procedieron hacer modificaciones al medio de cultivo observándose diferencias entre ellos, en cuanto a la actividad de glucosa oxidasa.

Finalmente se obtuvo que la composición del medio de cultivo deberá estar de acuerdo a los requerimientos de la enzima como se indica a continuación en la tabla 13.:

Tabla 13. Producción de glucosa oxidasa reportada en la patente
No.3, 701, 715, 1972.

<u>Composición del medio:</u>		
Contenido de carbohidratos *	(%)	1.5 - 2.5
DE del carbohidrato componente. **		65 - 80
Maíz saturado de agua	(%)	ca. 0.2
<u>Fuente de nitrógeno, (%) :</u>		
Urea		ninguno
Fosfato de diamonio		ninguno
Nitrato de amonio		ca. 0.2
Sulfato de magnesio heptahidratado		ca. 0.006
Ac. cítrico o ac. succínico		ca. 0.02
<u>Condiciones de fermentación :</u>		
pH durante la fermentación		4 - 6
Duración de la fermentación (hr)		9 - 12
Velocidad de aereación v. v. m		0.5 - 1.0
Presión del aire, p.s.i.g.		30
Temperatura, °C .		33 - 34
Agitación		vigorosa
Glucosa oxidasa producida por litro de caldo, unidades		3,000 - 6,500
Producción de micelio por litro,(gramos)		4 - 8
Actividad específica del micelio.U/g		800 - 1,500

*Mezcla de carbohidratos de almidones y dextrinas a partir de hidrólisis enzimática o ácida . [81]

**DE, equivalente de dextrosa, es la relación del azúcar reducido (expresado como dextrosa) entre el total de carbohidratos expresado en porcentaje.

En el proceso si el total de carbohidratos que compone el medio tiene un DE de 60 a 85 hay rápido y suficiente azúcar metabolizado, principalmente glucosa, para mantener el rápido crecimiento del hongo que produce glucosa oxidasa. Además de una reserva de carbohidratos de baja metabolización para mantener las células del hongo en estado activo con respecto a la formación de glucosa oxidasa. Si el total de carbohidratos tienen un DE menos del 60 no hay suficiente azúcar metabolizable, que permita el rápido crecimiento de las células del hongo. Pero si tiene un total de carbohidratos de 85 existe un rápido crecimiento y una cantidad limitada de células del hongo, pero las células son mantenidas en un estado de células productivas por solo un corto tiempo y por tanto menor cantidad de glucosa oxidasa es formada.

Los carbohidratos usados son: almidones, dextrinas, azúcares preparados por ácidos, hidrólisis enzimática de almidón y mezclas de tales sustancias.

El almidón se obtiene de una amplia fuente como son el maíz, trigo, arroz, papa, tapioca.

La concentración final de carbohidratos en el medio nutriente empleado en el proceso puede estar en el intervalo de 1.0 a 3.5 % y preferentemente en el intervalo de 1.5 a 2.5 . [81]

Tabla 14 .Actividad de glucosa oxidasa obtenida por diferentes medios de cultivo

Medio de Cultivo	Actividad (U/ml)
(23) Zetelk pH= 4.5 t= 18 horas	1.5
(12,72) Paskova y Munk pH= 4.0 t= 30 horas	0.3
(12,72) Paskova y Munk con CaCO_3 3.5 % pH = 5.8 t = 30 horas	1.0
(81) Patente pH = 4 - 6 T = 33- 24 °C t = 9 - 12 horas	3 - 6.5
(16,72) Jerzy Rogalski T =30 °C t = 48 horas pH = 5.6	1.8

Observaciones:

El medio reportado en la patente a pesar de que tiene una actividad alta de glucosa oxidasa y con un tiempo de 9 - 12 horas, parece ser el medio más efectivo. Sin embargo cabe aclarar que este medio se usa para producción a gran escala, lo que quiere decir también que utiliza equipo más sofisticado y con volúmenes grandes de producción. Por lo que no se recomienda para fines de producción de glucosa oxidasa a nivel de laboratorio. [81]

Por otra parte el medio Zetelk y Jerzy donde se observa que tiene buena actividad de glucosa oxidasa. Se pueden utilizar a nivel de laboratorio. Por su facilidad en cuanto a equipo y material empleado. Cabe mencionar que el medio utilizado por Jerzy es para un mutante de A. niger. [16,23,72]

Para la elección del medio de cultivo debe de tomarse en cuenta que no exista presencia de sales de amonio ($\text{NH}_4\text{NO}_3, \text{NH}_4\text{SO}_4$), ya que actúan como inhibidores de la enzima.

Los otros dos medios que son el de Paskova y Munk y el segundo siendo el mismo pero con adición de carbonato de calcio no reportan una actividad razonable superior a 1.0 U/ml, además de que el tiempo que se necesita para la producción de glucosa oxidasa es demasiado (30 horas). [12,72]

Por último el medio debe contener K, P, Mg deben ser provistos para el crecimiento de A. niger.

Una vez producida la enzima, ésta se debe liberar de la célula por medio de un método de ruptura celular. Existen varios métodos como se menciona a continuación.

CAPITULO 4

TECNICAS DE RUPTURA CELULAR PARA LA EXTRACCION DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA

4. EXTRACCION.

La recuperación de productos intracelulares es una operación multietapa basados primero en la concentración de células en un 50 % v/v solución seguidos de una ruptura celular. En las aplicaciones industriales se usa métodos mecánicos, los cuales son comercialmente disponibles, simples, efectivos y fácilmente escalables. [13]

Las condiciones de operación deben ser seleccionadas con base en la aplicación específica considerando la estabilidad del producto y la resistencia de la célula a la ruptura .[13]

La fase inicial del proceso de recuperación es la separación de la célula y del caldo. Consideramos que una enzima puede funcionar dentro de la célula (intracelular) y otras son segregadas por la célula (extracelular). [82]

La recuperación de las primeras implica la necesidad de romper la pared celular para poder liberar la enzima. Algunos métodos utilizados para ello son :

- a)Maceración del tejido con un abrasivo, como arena, o por alta velocidad, en especial con pulverizadores.
- b)Congelación y descongelación alternas.
- c)Deshidratación seguido de molienda, con la cual la materia queda en forma que permita fácilmente la extracción.
- d)Homogeneización seguida de centrifugación y a alta velocidad, para separar diversos cuerpos en forma de partículas, como mitocondrias que pueden contener ciertas enzimas.
- e)Autólisis.
- f)Ultrasonido.
- g)Químicos ácido, base y detergentes.

Para disolver la enzima por uno de los métodos mencionados se emplean agua, glicerina, o diversas soluciones amortiguadoras. [83]

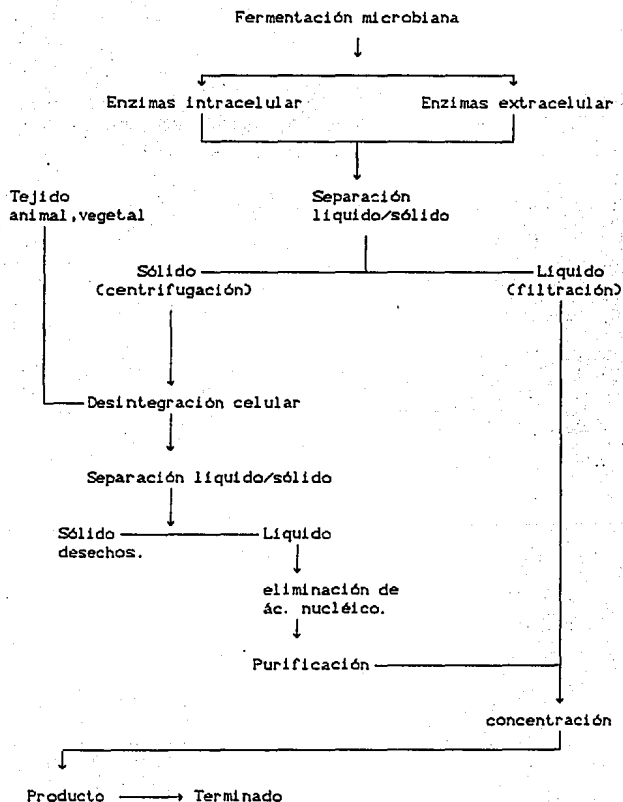
Para la recuperación del producto extracelular se separan de las células; estos productos están en bajas concentraciones. Por tanto la etapa inicial de recuperación consiste en clarificación y concentración. Las concentraciones de producto se encuentran en un rango de 0.1 a 100 mg por litro de cultivo. [20,21,64,83]

De las muchas técnicas disponibles no todas son adecuadas para trabajar a gran escala, debido a restricciones inherentes a las técnicas o a los aparatos disponibles, o al aumento del tiempo que usualmente acompaña la transición a un proceso a gran escala. Por ejemplo la ruptura eficaz de las células puede lograrse por sonicación, congelación y descongelación, o por molienda del material sólido, etc. En muchos casos el aumento de escala de estas técnicas no es práctico, y en otros el resultado no es el adecuado. De forma similar la ultracentrifugación es una técnica de laboratorio útil, pero no puede utilizarse convenientemente en los procesos a gran escala. [83]

La definición a "gran escala" se refiere a los procesos que utilicen uno o más kilogramo de pasta de células húmedas. El término de "extracción" se utiliza para definir los métodos de ruptura de los microorganismos y los términos "aislamiento y purificación" se refiere a otras técnicas implicadas en la obtención de un producto puro o específico. [83]

En la figura 3 se muestra un esquema general para la separación de enzimas.

FIG. 3 DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL PARA LA SEPARACION DE LAS ENZIMAS



Ya se mencionaron las técnicas generales para la extracción de enzimas ahora, se muestran las tres técnicas más usadas que se reportan para la extracción de la enzima glucosa oxidasa. También se dan algunas ventajas y desventajas de ellas.

- 4.1. Extracción por prensa francesa
- 4.2. Extracción por molienda con abrasivos
- 4.3. Extracción por ultrasonificación

4.1. PRENSA FRANCESA

Principio:

Método mecánico el cual consiste en mezclar la pasta celular con un abrasivo (ejemplo tierra diatomea) o se congela a -20°C , en cuyo caso los cristales de hielo actúan como abrasivo, después se ejerce presión de unos 10 a 15 Ton/in² (150 - 230 MP).

La ruptura de las células se debe a la fuerza de cizalla ejercidas y por abrasivos y/o los cristales de hielo formados en la pasta congelada.

Ventajas:

- Aunque el equipo utilizado quizá es algo complicado para ser usado rutinariamente, el hecho es que la ruptura de las células se realice a -20°C , es útil cuando se requiere extraer enzimas termoestables o termosensibles.

Desventajas:

- A pesar de que con este método se pueden obtener una extracción casi completa, no es recomendable para utilizarse a gran escala, por el costo y disponibilidad del equipo. (86)

Procedimiento:

La torta del micelio se lava repetidamente con agua destilada, se prensa entre papeles filtros manteniéndose congelada a -20°C hasta la extracción de la enzima. Dicha extracción se realiza en una prensa X (Biox-Sweden) de 25 ml de capacidad operando a -28°C . La concentración celular se evalúa determinando el contenido de materia seca sobre una alícuota de la suspensión y la actividad de la glucosa oxidasa en el sobrenadante de otra alícuota centrifugada a $15\,000 \times g$ durante 10 min a 4°C . [23,24]

4.2 MOLIENDA CON ABRASIVO.

Principio:

Es un método físico que consiste en la disrupción de microorganismos mediante agitación en presencia de perlas de vidrio o arena de mar. Mickie (1948) construyó un aparato que es el más utilizado para la separación de paredes de células microbianas a partir de bacterias, esporas bacterianas, microbacterias y hongos.

Esta ruptura consiste en ejercer una agitación a una frecuencia de 50 ciclos/seg., el recalentamiento se evita trabajando en cámara fría y el grado de rompimiento se calcula empíricamente.

La ruptura se debe a las fuerzas de cizalla producidas por los gradientes de velocidad. Además de las colisiones entre los organismos y el agente abrasivo.

El grado de desintegración depende de la velocidad de agitación, la concentración de microorganismo, la concentración y tamaño de las perlas y el tiempo de contacto.

Ventajas:

- Este método puede llevarse a gran escala obteniéndose buenos rendimientos.
- Se puede aplicar a bacterias resistentes a la ruptura. Es un equipo de fácil montaje y seguro cuando se trata de romper microorganismos patógenos o modificados genéticamente.
- El equipo está disponible en el mercado.

Desventajas:

- Desgaste de las perlas de vidrio.
- Regulación de la temperatura (cámara fría)
- No es muy recomendable para pequeñas cantidades de bacteria o a baja concentración. [86]

Procedimiento:

La ruptura celular se lleva a cabo con molienda con arena de mar y un amortiguador de fosfatos de 0.1 M a pH=5.6 . La eficiencia en la extracción de la glucosa oxidasa resulta ser muy alta en comparación con las otras dos enzimas, catalasa e invertasa que se encuentran dentro del micelio. [65]

Si se quiere comercializar glucosa oxidasa líquida, este sería un buen método de obtención ya que el rendimiento es muy alto y se inhiben otras enzimas que podrían considerarse como impurezas. Ver tabla 15.

Tabla 15. Comparación de actividad y porcentaje de recuperación por el método de molienda con abrasivo.

	Actividad* (U/g cel)	Actividad ext. (U/g cel)	% recuperación
Glucosa oxidasa	231, 400	217,000	93.77
Catalasa	512.31	132.9	25.94
Invertasa	792.5	212.8	26.85

*

Actividad de la célula.

[65]

4.3. ULTRASONICACION

Principio:

El término ultrasonido se utiliza para designar a los sonidos con frecuencias situadas por encima del nivel del oído humano (20 KHz) y que expresado en longitudes de onda, en los líquidos los sitúa en un rango de 6 a 2.4×10^{-4} cm ordenes de magnitud similares a los de la luz visible.

Utiliza el rápido movimiento sinoidal y la formación de burbujas que colapsan porque convierte la energía sónica en energía mecánica.

Las burbujas aumentan la presión la cual provoca una cavitación que produce el rompimiento de las células vegetales, animales y microbianas.

Ventajas:

- Es un método físico, útil y versátil para trabajar a escala de laboratorio.

Desventajas:

- La eficacia del tratamiento depende de varios parámetros como pH, Temperatura, fuerza iónica del medio de suspensión y el tiempo de exposición. La selección de una serie de condiciones es esencialmente empírica, variando en función del organismo y el producto que se desea obtener.
- Su aplicación a gran escala se ve limitada por la dificultad de transmitir suficiente potencia a grandes volúmenes de suspensión.

[13,52,86]

Procedimiento:

Para la preparación de extracto de células libres el micelio se suspende en 50 mM de un amortiguador de fosfato de potasio a pH de 7.0 la suspensión es sonicada a 20 kHz por 5 min. de 0 - 4°C con un desintegrador ultrasónico MSE 100 W. Al término de la ruptura el residuo es removido por centrifugación (20 min a 20 000 x g). [52]

Para la extracción de la enzima intracelular, la glucosa oxidasa de Aspergillus niger a nivel de laboratorio por alguno de los métodos de ruptura celular reportados se debe de considerar lo siguiente:

Condiciones de operación (pH , Temperatura).

Costo y disponibilidad del equipo.

actividad enzimática.

% de recuperación.

Analizando los tres métodos más comunes de extracción para glucosa oxidasa (ver tabla 16) , se puede decir que el método de molienda con arena de mar es el que cumple con una ruptura eficiente, disponibilidad de equipo, fácil manejo, alto rendimiento, actividad enzimática además, de que se puede hacer un escalamiento.

Tabla 16. Comparación de la actividad (U/g) por tres métodos de extracción y actividad enzimática para la glucosa oxidasa.

Método	Actividad U/g
(23,24) Prensa X	31, 980
Ultrasonificación (52)	108, 000
(65) Molienda con abrasivos	217, 000

Una vez teniendo la enzima disponible en el extracto crudo, se procede a su purificación con el fin de obtener un producto más estable, sin que se vea afectada su actividad enzimática. En seguida se dará algunas generalidades sobre purificación.

CAPITULO 5

TECNICAS DE PURIFICACION

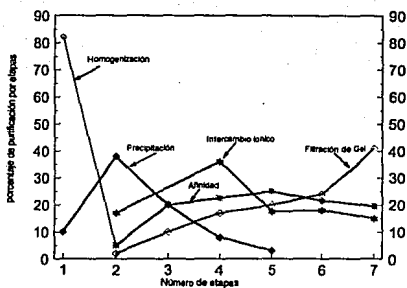
DE LA GLUCOSA OXIDASA

5. PURIFICACION .

El objetivo de la purificación es el obtener una enzima de calidad que cumpla con las especificaciones del mercado (pureza, concentración, conformación, baja en impurezas, estabilidad, etc.) así como el costo. Los requerimientos de costo, pureza y actividad enzimática varían según el método de extracción y purificación empleado.

Frecuentemente las enzimas pueden ser purificadas varias veces, pero el rendimiento es mínimo, abajo del 10% de la actividad del material original. En la industria se purifica la enzima lo menos que se pueda; sólo cuando el material interfiera en la catálisis de la enzima. [13]

En la purificación de enzimas debe emplearse el mínimo número de etapas de purificación, las cuales deben ser compatibles con su uso, en la tabla 17 se observa que el costo aumenta conforme aumenta el número de etapas de purificación. Así mismo Bonnerjea y colaboradores, analizaron 100 publicaciones a nivel escala de laboratorio durante proceso de purificación de proteína. Ellos graficaron los resultados (ver gráfica 4), donde se muestra el número de etapas usadas en el esquema de purificación como una función de la frecuencia del método usado en cada etapa. La homogeneización es frecuentemente usada como la primer etapa de purificación, porque la mayoría de las proteínas son intracelulares, de aquí de romper la célula. La precipitación es conocida como una purificación gruesa seguida de métodos resolutivos como son intercambio iónico y métodos de afinidad. [13,47]



Gráfica 4. Porcentaje de purificación por etapas

[47]

Tabla 17. Efecto del número de etapas en la producción y costo de un proceso común.

Etapas	Peso relativo	Producto %	Actividad específica	Costo total	Costo/peso	Costo por actividad
	1	100	1	1.0	1.0	1.0
1	0.25	75	3	1.1	4.0	1.47
2	0.063	56	9	1.2	19	2.13
3	0.016	42	27	1.3	83	3.08
4	0.004	32	81	1.4	358	4.92
5	0.001	24	243	1.5	1536	6.32

[13]

La purificación innecesaria puede ser evitada en etapas adicionales en términos de equipo, mano de obra y pérdida de actividad enzimática. El contenido de la preparación de las enzimas pueden ser tan alta como sea posible (ejemplo; 10% p/p de proteína).

Esto quizá resulte por el desarrollo de las condiciones de fermentación o por ingeniería genética. Como resultado, algunas preparaciones de enzimas comerciales consisten esencialmente en la concentración del caldo de fermentación, y en el empleo de aditivos caros para estabilizar la actividad de la enzima. [13]

Es muy importante que la actividad máxima sea retenida durante la preparación de enzimas. La inactivación de enzimas puede ser causada por calor, proteólisis, pH no óptimo, oxidación, adulteradores, inhibidores irreversibles y pérdida de cofactores y coenzimas, de estos la inactivación por calor junto con efectos de pH son los más importantes. [13]

Por esta razón el elegir el método de extracción y purificación de la enzima sea (intra o extracelular) es primordial. [13]

Las proteínas pueden separarse entre sí basándose en las diferencias de :

- 1) Tamaño
- 2) Propiedades de solubilidad
- 3) Carga eléctrica
- 4) Comportamiento frente a la absorción .
- 5) Afinidad biológica de una proteína para un ligando específico.

[46,78,83,86]

La separación de proteínas basándose en el tamaño molecular puede realizarse por diferentes formas de centrifugación, en gradiente de densidad, y por cromatografía de exclusión molecular. También pueden separarse por sus diferencias de solubilidad, según cuatro variables: pH, fuerza iónica, constante dieléctrica del medio y temperatura. La separación de las proteínas basándose en la carga eléctrica depende de sus propiedades ácido- básicas, que constituyen un reflejo de los grupos R ionizables de las cadenas polipeptídicas. Cada proteína posee un pH isoelectrico característico en el cual no se desplace en el campo eléctrico. Por encima del pH isoelectrico posee una carga negativa y por debajo de él, una carga positiva neta. Las precipitaciones por salado y punto isoelectrico son de la mayor utilidad. [46]

Por último pueden separarse basándose en sus velocidades de movimiento en un campo eléctrico (electroforesis libre en solución acuosa o por electroforesis de zona en un gel o soporte semisólido).

La electroforesis discontinua y electroenfoque isoelectrico proporcionan gran capacidad de resolución. Otro método es cromatografía de intercambio iónico. [46]

A continuación se indican los métodos de purificación de enzimas que se conocen:

5.1. Separación de los ácidos nucleicos:

Los ácidos nucleicos se consideran como contaminantes, por lo que se eliminan del extracto sin dañar la enzima, por lo que se precipitan formando complejos entre los residuos fosfato con carga negativa de las moléculas del ácido nucleico y los grupos cargados positivamente del agente precipitante. La precipitación de los ácidos nucleicos depende de la concentración de sal. A continuación se mencionan algunos métodos:

- 5.1.1. Fuerza de cizalla.
- 5.1.2. Bromuro de cetiltrimetilamonio.
- 5.1.3. Sulfato de estreptomicina.
- 5.1.4. Polietilenoimina.
- 5.1.5. Tratamiento con nucleasas [74,86]

5.2. Concentración por precipitación con solventes orgánicos.

La adición de solventes orgánicos a soluciones acuosas de proteína reduce la solubilidad de éstas al reducir la constante dieléctrica del medio. Cuando se van añadiendo cantidades crecientes de solventes orgánicos, las moléculas de proteína interaccionan más con otras moléculas de proteína que con el agua.

La formación de complejos entre moléculas de proteína de distinta carga continúa hasta que se alcanza un punto en el que la proteína precipita, debido al decrecimiento de la constante dieléctrica y por lo tanto al aumento de las fuerzas atractivas electrostáticas entre las moléculas de proteína de distinta carga. Se puede utilizar lo siguiente:

- 5.2.1. Sulfato de amonio.
- 5.2.2. Solventes orgánicos.
- 5.2.3. Polímeros de peso molecular elevado . [25,26,74,86]

5.3. Concentración por ultrafiltración.

La ultrafiltración utiliza las diferencias existentes entre los pesos moleculares (tamaño) de la proteína deseada y de las no deseadas .

Se puede considerar como una de las técnicas de filtración que incluyen la ósmosis inversa (PM límite de 250), ultrafiltración (500 y 300 000) filtración de micropartículas y filtración de partículas con un cierto solapamiento entre la ultrafiltración y la filtración de micropartículas.

Algunas de las características que hacen de la ultrafiltración un método útil son :

- 5.3.1. A temperatura de operación baja, por ejemplo, ultrafiltración en una cámara fría, de -5°C a $+5^{\circ}\text{C}$, se evitan pérdidas en la actividad debidas a la exposición a altas temperaturas y se minimiza la autodigestión.
- 5.3.2. No se necesita cambio de fase.
- 5.3.3. Se trabaja a una presión hidrostática baja
- 5.3.4. Es suave y no destructiva.
- 5.3.5. No necesita reactivos químicos.
- 5.3.6. Se puede conseguir simultáneamente la concentración y purificación.
- 5.3.7. El mantenimiento de la fuerza iónica y del pH del concentrado evita la inactivación de la enzima.
- 5.3.8. Es económica. [74,86]

5.4. Concentración por liofilización.

Aunque, en algunos casos, la liofilización se puede utilizar para la concentración de proteínas, su empleo es limitado, ya que al menos que la concentración de sal en la solución sea muy baja se pueden formar mezclas eutécticas, lo que daría lugar a un secado incompleto o a la formación de una gran cantidad de espuma y desnaturalización de las proteínas.

Estos problemas pueden evitarse controlando cuidadosamente la temperatura de la masa congelada para mantener una temperatura por debajo del más bajo de los puntos eutécticos. También puede ser necesario reducir la concentración de sal antes de la liofilización.

Puesto que se dispone de otros métodos de concentración de proteínas, este procedimiento se reserva para la preparación de materiales que deban ser almacenados o transportados. [74,86]

5.5. Cromatografía en gel.

El interés de esta técnica radica en su capacidad para fraccionar y purificar enzimas .

El proceso de cromatografía en gel consiste en el reparto de las moléculas de soluto entre la fase móvil de solvente y la fase estacionaria constituida por los espacios existentes entre las partículas porosas del gel. El mecanismo de esta técnica es más fácil de comprender, se considera que el gel tiene una estructura porosa similar a la del pan. La fase móvil es el líquido que circula por el exterior de las partículas de gel, y se conoce como volumen vacío (V_o), mientras que la fase estacionaria es el líquido que ocupa en el interior de las partículas de gel (V_i). El soluto se distribuye por difusión entre la fase estacionaria y la móvil. El volumen ocupado por la matriz del gel (V_g) también contribuye al volumen total de la columna (V_t), que es:

$$V_t = V_o + V_i + V_g$$

La elección del tipo de gel depende principalmente del peso molecular de la enzima, en la tabla 18 se muestran algunas de las características de los geles. [26,74,86]

Tabla 18. Propiedades de geles de Sephadex.

Tipo de gel	Agua retenida (g / g gel)	Magnitud de dilatación de (ml / g gel)	Peso molecular de las moléculas excluidas del gel .
G - 25	2.5	5	3,500 a 4,500
G - 50	5.0	10	8,000 a 10,000
G - 75	7.5	14	40,000 a 50,000
G - 100	10.0	20	100,000
G - 200	20.0	40	200,000

[17]

5.6. Cromatografía de intercambio iónico.

Dentro de las celulosas pueden introducirse una gran variedad de grupos cargados, bien catiónicos o aniónicos. La celulosa ha sido el medio tradicional de llevar a cabo la cromatografía de cambio de iones para las proteínas.

Se usan :

5.6.1. Resinas intercambiadoras de iones.

5.6.2. Celulosas intercambiadoras de iones.

5.6.3. Otros geles intercambiadores de iones. [25,74,86]

5.7. Cromatografía de afinidad.

La cromatografía de afinidad quizás sea la forma más elegante de purificar proteínas individuales a partir de una mezcla compleja. Sin embargo, aunque se emplea con frecuencia a escala de laboratorio rara vez se utiliza en la purificación de proteínas a gran escala.

Esta se basa en la interacción más o menos específica entre una proteína y un ligando inmovilizado, que esta incluido en uno de estos dos grupos principales:

5.7.1. Aquellos que sean específicos para la proteína deseada, en cuyo caso el ligando es generalmente un anticuerpo, un sustrato, un sustrato análogo o un inhibidor. [74,86]

5.7.2. Aquellos que interaccionan con varias proteínas, y que pueden ser específicos para las diferentes clases de enzimas, como el 5' AMP, 2', 5' ADP o NAD^+ , o que interaccionan con un amplio rango de proteínas tales como las cadenas hidrocarbonadas o algunos colorantes.

Es esencial que la interacción sea reversible. Se pueden emplear una gran variedad de diluyentes para disolver una proteína de un ligando de afinidad, que van desde métodos no específicos como el incremento de la fuerza iónica o la alteración del pH hasta métodos específicos que usan el cofactor o ligando libre. [25,26,68,86]

5.8. Absorbentes no específicos:

5.8.1. Hidroxilapatito.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

El hidroxilapatito (HAD) se ha usado durante mucho tiempo en técnicas discontinuas para la purificación de enzimas. El método ha ido ganando aceptación lentamente entre los químicos de las proteínas, debido a su laboriosa preparación, desconocimiento de los mecanismos de interacción entre las proteínas y esta sustancia, su alto costo, su poca fiabilidad en lo que respecta a la estructura de sus cristales, la velocidad de flujo y la capacidad de adsorción.

Sin embargo, se considera que la cromatografía en hidroxilapatito debería de usarse como una herramienta adicional en la purificación de proteínas, puesto que la base de la separación es diferente de la de los cambiadores de iones o de la filtración en gel. [86]

5.9. Cromatografía de interacción hidrofóbica.

Esta fue desarrollada a raíz de la observación de que algunas proteínas eran retenidas inesperadamente en geles de afinidad que contenían brazos espaciadores hidrofóbicos. Este hallazgo se aplicó a la preparación de familias de adsorbentes hidrofóbicos utilizando cadenas hidrocarbonadas de series homólogas de diferentes longitudes. En la práctica, la mayoría de las proteínas pueden purificarse satisfactoriamente utilizando substituyentes C-8 o fenilo. [86]

5.10. Cromatografía líquida de alta resolución.

Originalmente esta técnica se diseñó para separar pequeñas moléculas orgánicas solubles en solventes no acuosos, aunque rápidamente se adecuó para la separación de compuestos biológicos de mayor tamaño, solubles en agua. [86]

5.11. Técnicas electroforéticas:

Se basan simplemente en la aceleración de las partículas cargadas en un campo eléctrico, a las que se opone la fricción debida al paso de las partículas a través del medio que las rodea, de modo que se mueven a una velocidad constante proporcional a su carga. Los cationes se mueven hacia el cátodo y los aniones hacia el ánodo.

Se pueden mencionar las siguientes técnicas :

5.11.1. Electrofóresis.

5.11.2. Enfoque isoelectrico.

5.11.3. Electrodecantación con multimembranas.[68,86]

5.12. Cromatoenfoque.

El cromatoenfoque es una forma de enfoque isoelectrico realizado en un lecho de resinas cambiadoras de iones especiales, llevando a cabo la dilución con soluciones anfóteras.

El cromatoenfoque combina el poder de resolución del enfoque isoelectrico con la comodidad de la cromatografía, por lo que es muy adecuado para trabajar a gran escala.[86]

5.13. Separación en dos fases acuosas.

Los sistemas en dos fases acuosas pueden formarse mezclando soluciones de polietilenglicol y dextrano o polietilenglicol y ciertas sales, especialmente sulfato de amonio o fosfato potásico. Las proteínas y los restos celulares se reparten entre las dos fases, de tal manera que la localización exacta de una proteína en particular depende de parámetros tales como su peso molecular, el pH y la fuerza iónica de la mezcla y la presencia de iones polivalentes (Kula 1979).

Los sistemas en dos fases pueden aplicarse para eliminar eficazmente los restos de células de homogeneizadas consiguiendo al mismo tiempo un cierto grado de purificación. [86]

5.14. CONSIDERACIONES EN LA PURIFICACION DE ENZIMAS.

5.14.1. La naturaleza de la solución, la cual puede venir de diferentes fuentes (cultivos vegetales, microbianos) ,puede ser intra o extracelular.

5.14.2. Especificaciones del producto, aspectos tales como pureza, forma y costo que dicta la aceptabilidad del proceso de purificación.

5.14.3. La elección de las etapas y equipo a utilizar, así como el orden en que deben ser usadas. Las etapas deben ser complementarias una a otra en el grado de purificación .

5.14.4. Minimizar el número de solventes y amortiguadores empleados, ya que los solventes innecesarios y cambios de amortiguador pueden ser costosos. Se evita si es posible, amortiguadores que sean caros, complicados de preparar y difícil de ajustar el pH.

5.14.5. Debe evitarse etapas donde se pierda la actividad enzimática total o parcialmente debido a cambios de pH, temperatura, que puedan provocar una desnaturalización. [47]

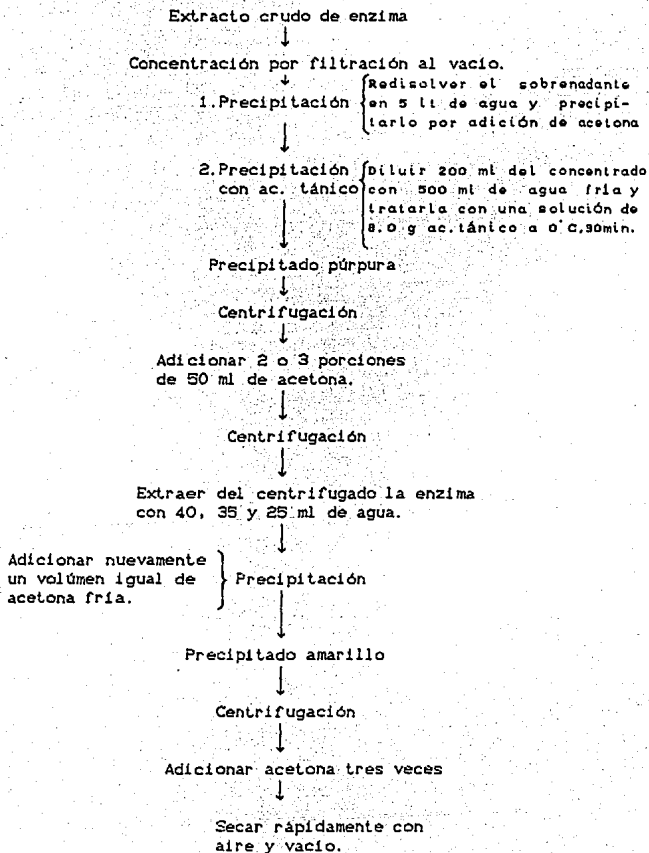
Después de conocer algunos métodos de purificación de enzimas y aspectos que deben tomarse en cuenta para realizarla, es importante hacer notar que no todos los métodos de purificación se aplican a todas las enzimas. Estos varían según sus características y de la disponibilidad de material y equipo. En el caso de glucosa oxidasa se reportan diferentes técnicas las cuales emplean una combinación de las mismas.

Estas son :

- 5.15.1. Precipitación con acetona y ácido tánico. [3]
- 5.15.2. Precipitación con sulfato de amonio. [3]
- 5.15.3. Precipitación con alcohol, diálisis, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en DEAE celulosa. [85]
- 5.15.4. Precipitación con ácido tánico, acetona y cromatografía. [51]
- 5.15.5. Cromatografía en una columna de Sepharosa y sulfetil (SE), sephadex C-50. [51]
- 5.15.6. Precipitación, diálisis, cromatografía de Amberlite y columna de DEAE celulosa. [1]

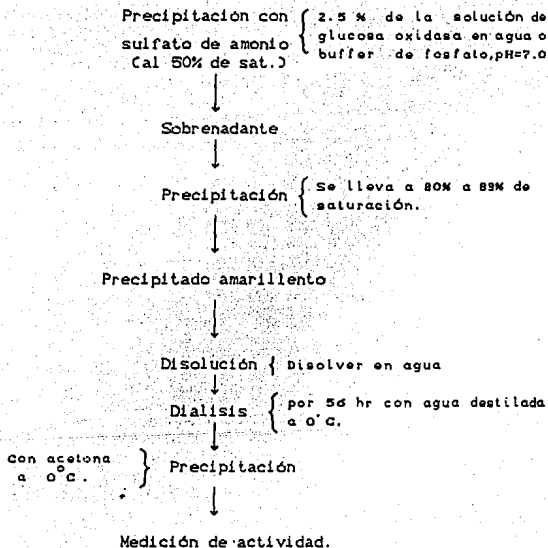
Técnica S.15.1.

Purificación por precipitación con acetona y ác.tánico



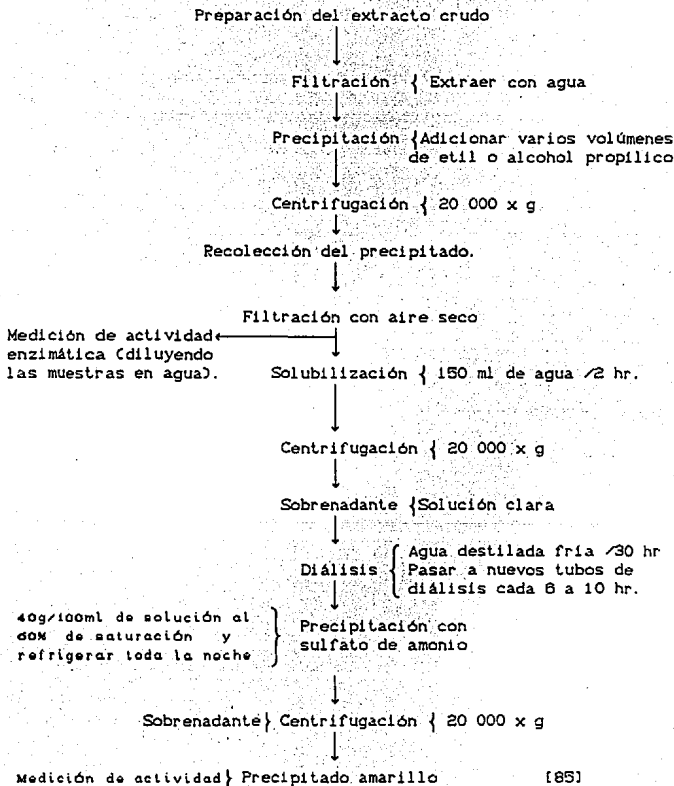
Técnica 5.15.2.

Purificación por precipitación con sulfato de amonio.



Técnica 5.15.3.

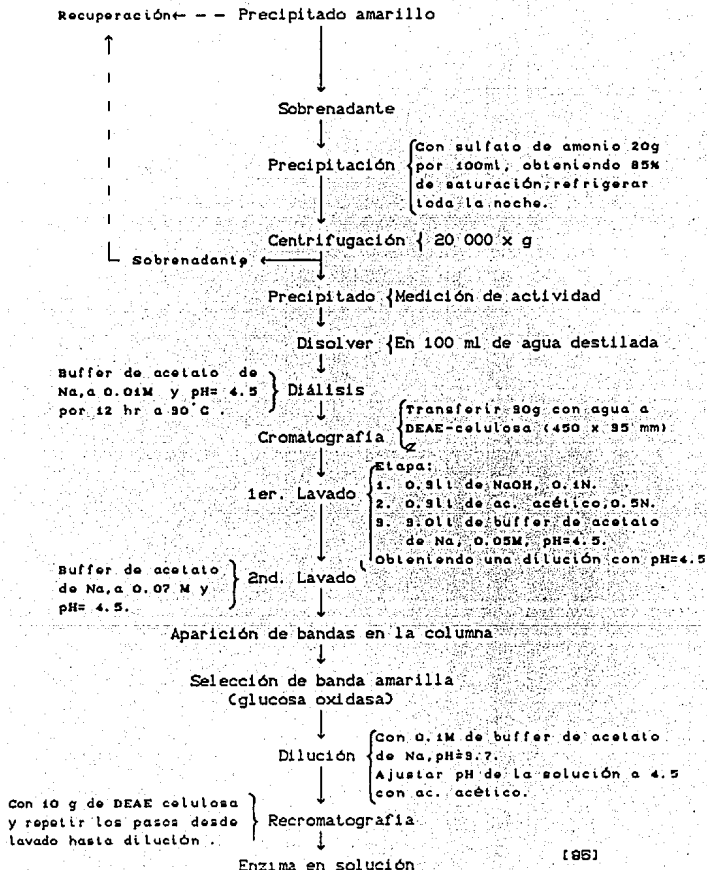
Purificación por precipitación con alcohol, sulfato de amonio, diálisis, cromatografía en DEAE - celulosa.



[85]

Continua...

Continuación de la técnica 5.15.3.



La actividad de glucosa oxidasa obtenidas en las etapas de purificación de la técnica 5.15.3 se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. Actividades de glucosa oxidasa obtenidas en varias etapas de purificación .

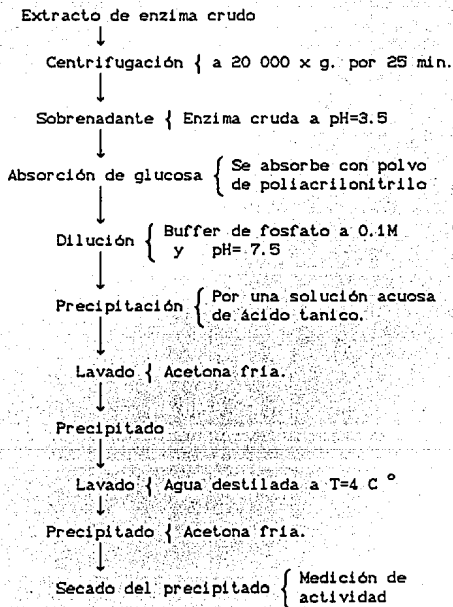
Fracción	Volumen ml	Unidades por ml.	Total de unidades	U /mg de proteína.
Muestra inicial de enzima.	205	541	112,000	16
Después de diálisis	563	186	105,000	51
Después de la fraccionación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100	680	68,000	-
1er. Cromato- grafía.	77	766	59,000	-
2da. Cromato- grafía.	60	802	54,000	130

Se parte de un concentrado de enzima crudo.

[85]

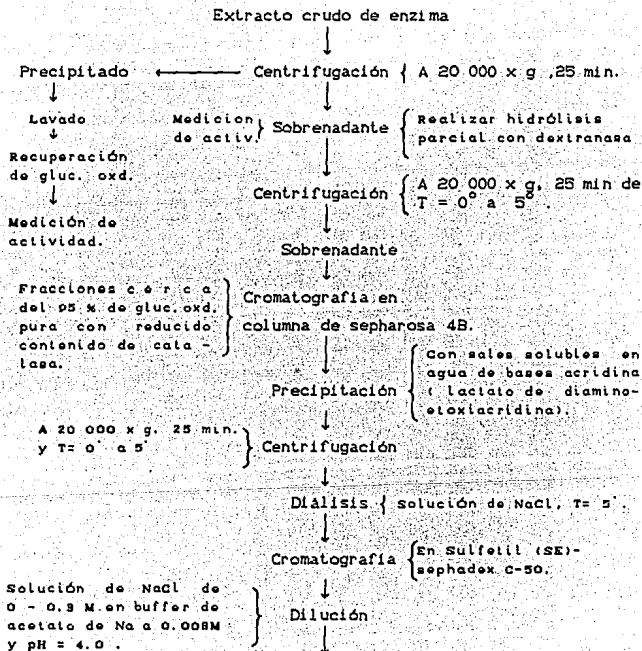
Técnica 5.15.4.

Purificación por precipitación con ácido tánico,
acetona y cromatografía .



Técnica 5.15.5.

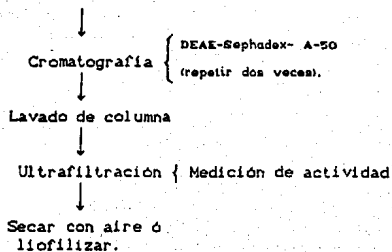
Purificación por cromatografía en una columna de sepharosa.



[51]

Continúa

Continuación de la técnica 5.15.5.

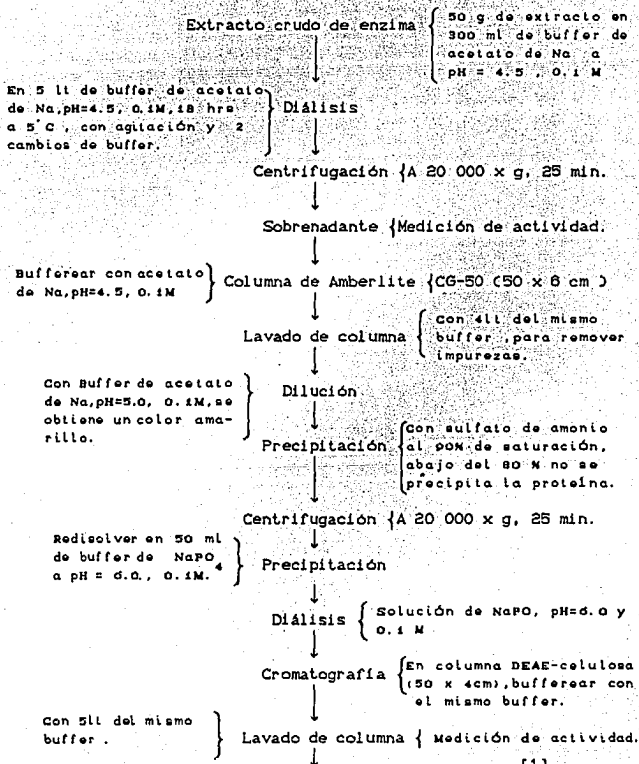


[51]

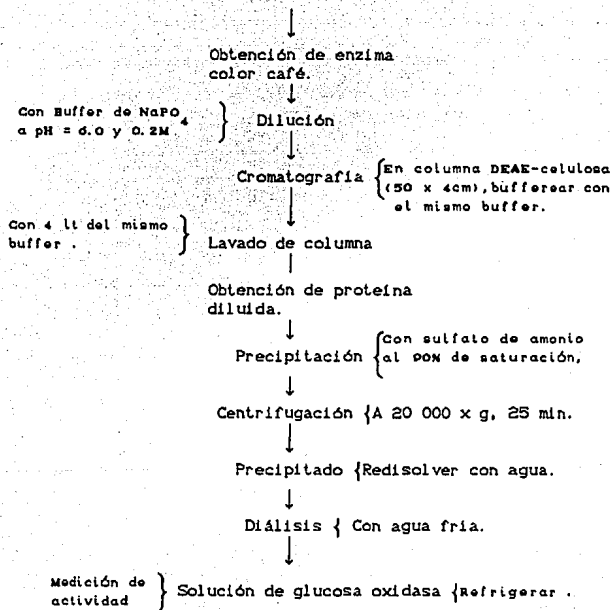
Nota : En cada etapa de purificación
se mide la actividad enzimática.

Técnica 5.15.6.

Purificación por diálisis, cromatografía en Amberlite, precipitación, y cromatografía en columna de DEAE-celulosa.



Continuación de la técnica 5.15.6.



En la siguiente tabla se muestra la actividad específica obtenida después de cada etapa de purificación de la técnica 5.15.6.

Partiendo de un extracto crudo de enzima de 50 g del *Aspergillus niger*, con una actividad de 1.45 U/mg (peso seco) o 13.9 U/mg de proteína. [1]

Tabla 20. Actividad y recuperación de la glucosa oxidasa durante el proceso de purificación.

Actividad y recuperación de glucosa oxidasa durante el proceso de purificación.			
Procedimiento	Volumen (ml)	Actividad específica (mmoles/min/ mg proteína)	Total de unidades (mmoles/ min)
Después de diálisis	374	28	72 500
Cromatografía Amberlit CG-50	1,920	78	59 500
Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y diálisis.	88	82	56 000
Cromatografía en DEAE-Celulosa	500	92	34 000
Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y diálisis.	30	92	32 600

La glucosa oxidasa obtenida por esta técnica contiene 0.90 mg de proteína por ml, estimado por el método de biuret. La actividad específica de glucosa oxidasa purificada a 37°C, pH= 5.6, fué de 83 U/mg de proteína (peso seco) o 92 U/mg de proteína. [1]

A continuación se dan algunos comentarios de las técnicas aquí reportadas.

No se encuentra reportada la actividad enzimática en la técnica 5.15.1, cuando se purifica con acetona y ácido tánico. Por lo que se descarta por no contar con este parámetro importante para la elección de la técnica de purificación de glucosa oxidasa.

La técnica 5.15.2, al igual que la anterior no se tomó en cuenta. Además de utilizar altas concentraciones de sulfato de amonio que de no ser retirado de la enzima puede interferir en la cuantificación de proteína por el método de biuret. Según lo reportado en la tabla 20 y 21, la precipitación con sulfato de amonio debe de ir seguida de diálisis y cromatografía para que la purificación sea efectiva.

Sin embargo, las técnicas 5.15.3, 5.15.4, 5.15.5 y 5.15.6, si reportan la actividad enzimática de la glucosa oxidasa (ver tabla 21) donde se observa que la técnica 5.15.5 reporta la mayor actividad de glucosa oxidasa.

Tabla 21. Actividad específica de glucosa oxidasa reportadas en las técnicas 5.15.3, 5.15.4, 5.15.5 y 5.15.6.

Técnica	U / mg de proteína
5.15.3. Precipitación con alcohol, sulfato de amonio, diálisis y cromatografía en DEAE-celulosa. [85]	130
5.15.4. Precipitación con ácido tánico, acetona y cromatografía. [51]	108
5.15.5. Cromatografía en columna de sepharosa y sulfetil C-50. [51]	225
5.15.6. Precipitación con sulfato de amonio, diálisis, cromatografía en Amberlite y columna de DEAE-celulosa. [1]	92

Por lo que proponemos la técnica 5.15.5 para la purificación de glucosa oxidasa ya que se obtiene una actividad específica de 225 U/mg de proteína y con un contenido de catalasa de 0.08 U/mg de proteína.

CAPITULO 6

METODOS PARA MEDIR LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

6. METODOS DE MEDICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Las reacciones catalizadas por enzimas pueden seguirse espectrofotométricamente, ya que muchos de los substratos o productos de las enzimas absorben la luz visible o no visible. Esta es la forma más sencilla y común de analizar enzimas, y consisten en obtener curvas completas mediante control directo y continuo de la reacción. Los análisis espectrofotométricos son particularmente comunes en enzimas que utilizan coenzimas de nicotinamida que absorben a 340 nm en su forma reducida.

Otros análisis se basan en el cambio de pH producido durante la reacción que se mide con un potenciómetro, en controlar el consumo o liberación de oxígeno durante la reacción mediante un electrodo de oxígeno, o más generalmente medir la liberación de gas con un manómetro (aparato de Warburg), en muchos casos los análisis son considerablemente más sensibles cuando se utilizan medidas de fluorescencia. [86]

Los métodos pueden ser convenientemente divididos en dos grupos: directos e indirectos. Un método directo proporciona algún dato que esta relacionado con la concentración del substrato o el producto, mientras que procede la reacción enzimática, sin necesitar de intermediarios. La detección efectuada en el instrumento de medición, en el que se observa algún cambio en la señal, corresponde a cambios en las propiedades en la solución enzimática. Los métodos directos son generalmente los más rápidos, proporcionan información continua acerca de la reacción enzimática (especialmente si el equipo esta acoplado a una computadora). [74,86]

Los métodos indirectos requieren un período de incubación seguido de otras manipulaciones, antes de que se pueda relacionar la lectura obtenida con la concentración del substrato o el producto; por su naturaleza los métodos indirectos son discontinuos. [19,20,22]

A continuación se clasifican los métodos directos e indirectos. en la tabla 22.

Tabla 22. Métodos directos e indirectos

<u>Métodos directos</u>	
Métodos Ópticos	Espectrofotometría
	Espectrofluorometría
	Rotación óptica
	Dispersión de la rotación óptica / distor- sión circular. (ORD/CD)
	Colorimetría con indicadores
Métodos Potenciométricos	pH, pH- estacionario
	Gas disueltos y electrodos específicos.
	Electrodos iónicos específicos
Propiedades físicas	Viscosidad.
Propiedades Coligativas	Crioscopia
	Osmometría
	Elasticidad
<u>Métodos indirectos</u>	
Reacciones Químicas	Colorimetría
	Titulación
Separación del producto	Precipitación
	Cromatografía
	Extracción
	Difusión en gel

[19,20,22]

Debido al tratamiento que sufre la enzima durante el proceso de purificación, es necesario evaluar la actividad enzimática en cada una de las etapas para observar si se ha mantenido disminuido o perdido parcial o totalmente esta. Por lo tanto se utilizara algún método de evaluación.

Los métodos reportados para la medición de la actividad enzimática de la glucosa oxiadasa son:

Manométrico

Conductividad diferencial

Colorimétrico

Titulación

Solución sin amortiguar.

[3,23,24,45,77,81,84,85]

Observaciones:

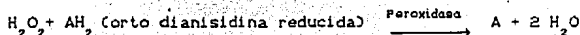
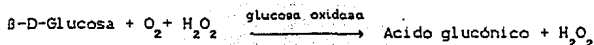
El método manométrico mide la cantidad de oxígeno consumido de 10 mm^3 de oxígeno por minuto en un manómetro de Warburg a 30 o 37°C. Sin embargo este método presenta limitantes como son la velocidad de oxígeno consumido que a veces no se registra. [23,24,84,85]

La titulación es un método económico pero largo y tedioso, las desventajas que presenta es que los reactivos se deben de preparar una hora antes de la medición, los volúmenes que se utilizan deben ser exactos y en algunas ocasiones se adiciona antiespumante a los tubos a titular. [45]

La actividad de glucosa oxidasa es usualmente determinada por la medición de la velocidad inicial de consumo de oxígeno en una solución amortiguada, la cual contiene un exceso de glucosa y es inicialmente saturada con oxígeno. En el nuevo método, su actividad en una solución sin amortiguar es evaluada por la medición de la concentración de ácido glucónico mientras el oxígeno es continuamente burbujeado. La principal diferencia son la adición de un amortiguador en el método tradicional y un mayor tiempo de reacción en el nuevo método. Por lo tanto no es práctico cuando se requiere manejar gran número de muestras. [77]

El método de conductividad diferencial presenta la desventaja de que a concentraciones 0.0045 % de peróxido de hidrógeno las burbujas producidas interfieren con la medición además de que el agua destilada utilizada varía con el tiempo con respecto al oxígeno disuelto. La ventaja es que ofrece la medición de pequeños cambios de conductividad y esta puede ser llevada a cabo en menos de 5 minutos transcurrida la reacción a altas concentraciones y aproximadamente 15 minutos a bajas concentraciones de glucosa oxidasa [84]

Del análisis bibliográfico se encontró que el método colorimétrico ha sido utilizado por diferentes autores para evaluar la actividad de la glucosa oxidasa en extractos celulares, preparados purificados y a nivel de enzima inmovilizada. Por lo que recomendamos este método para la medición de actividad enzimática. Además de que se obtienen resultados confiables y reproducibles. Se realiza la determinación colorimétrica del peróxido de hidrógeno producido en la reacción con peroxidasa y una sustancia cromógena como clorhidrato de orto dianisidina, según:



Se usan otros colorantes como la σ -toluidina, 2,6-diclorofenolindofenol y otros disponibles bajo nombres comerciales.

Este método colorimétrico puede lograrse midiendo espectrofotométricamente la marcha de la reacción o bien deteniendo la misma a un tiempo determinado por adición de ácido inhibiendo la absorbancia resultante en un espectrofotómetro de Beckman 25 con celda de 1 cm. de espesor a 530 nm. Esta técnica es sensible a razón de 0.1 unidad de absorbancia que corresponde a 8×10^{-3} micromol por mililitro de peróxido de hidrógeno. Una probable causa de interferencia en el método colorimétrico puede ser debida a la presencia de catalasa, que normalmente acompaña a la glucosa oxidasa en el micelio del hongo. Este método es rápido, sensible y de fácil realización por lo tanto es ventajoso frente a los métodos basados en la medida de oxígeno o formación de ácido glucónico. [24]

Una vez que se determina la actividad enzimática de glucosa oxidasa en el extracto crudo y después de cada etapa de purificación, se procede a cuantificar la proteína.

Para esto se conocen varios métodos como el método Kjeldahl, absorción U.V. a 280 nm, reacción de Folin-ciocateu y el método de Biuret.

Para la elección del método se debe de considerar las ventajas y desventajas que ofrece cada uno de los métodos.

Método

Principio

Kjeldahl

La digestión en ácido sulfúrico en presencia de un catalizador convierte a todas las formas de nitrógeno de la muestra en ión amonio, que se separa del digestante por destilación a vapor y se analiza por titulación.

Desventajas

Es un método costoso por el equipo y reactivos, requiere de mucho tiempo y cantidades grandes de muestra. además de ser un método destructivo. [5,46,75]

Absorción U.V. a 280 nm.

La absorción ultravioleta a 280 nm se debe a los residuos (grupos aromáticos) de la tirosina, fenilalanina y triptófano.

Desventajas

Las proteínas no contienen las mismas cantidades de residuos (algunos no las poseen).

Ventajas

Es un método no destructivo y rápido.
[5,18,46,53]

Reacción de Folin - Ciocalteu

La reacción se debe a la reacción de la tirosina con el ácido fosfomolibdotúngstico.

Desventajas

Es un proceso muy sensible.
No se puede usar en presencia de fenoles.
Las proteínas contienen proporciones variables de tirosina, aunque algunas no las tienen, esto provoca problemas en la absorción de U.V.

Ventajas

Utiliza pequeñas cantidades de muestra.
[5,46]

Biuret

Las proteínas reaccionan con el sulfato de cobre con hidróxido de sodio formando un complejo violeta de "Biuret". Donde la intensidad del color violeta es proporcional a la concentración de proteína.

Desventajas

No se puede utilizar en presencia de sales de amonio.

Ventajas

Los reactivos que utiliza están disponibles en el mercado. Es un método rápido y económico, emplea pequeñas cantidades de muestra y se aplica a todas las enzimas . [5,46,48,74]

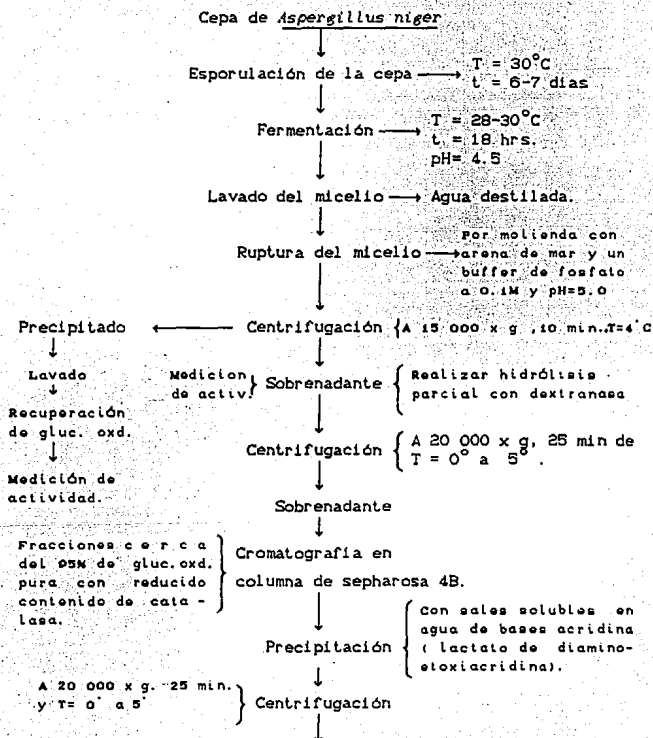
Por lo tanto, por las ventajas que ofrece el método de Biuret, éste se utilizará para la cuantificación de proteína. Además el método de purificación que se propone no utiliza sales de amonio que puedan interferir en la cuantificación.

Por las ventajas que ofrece el método de Biuret, éste se utilizará para la cuantificación de proteína. Además el método de purificación que se propone no utiliza sales de amonio que puede interferir en la cuantificación.

CAPITULO 7

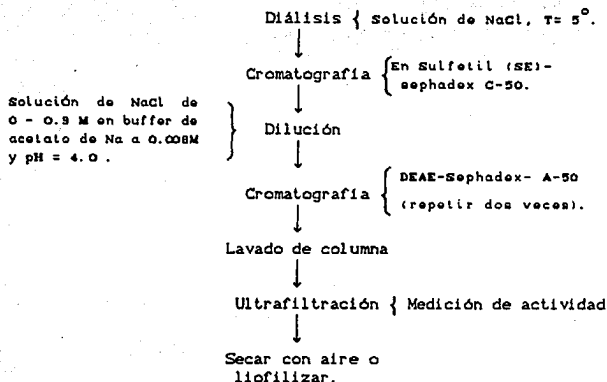
METODOLOGIA A SEGUIR PARA LA
FERMENTACION, EXTRACCION,
PURIFICACION Y ANALISIS DE
LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.
DE LA GLUCOSA OXIDASA.

Método propuesto para la fermentación, extracción, purificación y análisis de actividad enzimática para la glucosa oxidasa.



continúa.

Continuación.



[18,23,24,48,51,65]

Nota : En cada etapa de purificación se mide la actividad enzimática por el método colorimétrico y además se cuantifica la cantidad de proteína por el método de Biuret.

Esta técnica usa resinas de celulosa que tienen la ventaja de ser estables a los esfuerzos mecánicos, además de su gran capacidad para absorber proteínas y su rápida sedimentación. Cuando están empaquetadas en columnas permiten altas velocidades de flujo.

Una desventaja es que algunas proteínas no pueden resistir las duras condiciones necesarias para la dilución de estas resinas. No obstante, las resinas cambiadoras de iones se usan con éxito en la purificación de proteínas.

A continuación se describe brevemente dicha secuencia.

Se parte de una cepa de Aspergillus niger, está se coloca en un medio para la esporulación, que tiene como objetivo mantener al microorganismo vivo. Después se pasa a un medio (Zetalk) para su fermentación, se lava con agua destilada para posteriormente llevar a cabo la ruptura del micelio con arena de mar, el extracto obtenido se centrifuga a 20 000 x g por 25 min. Se mide la actividad enzimática en el precipitado y sobrenadante. Al sobrenadante se le realiza una hidrólisis parcial con dextranasa, la cual actúa rompiendo el biopolímero y dejando libre a la glucosa oxidasa, se centrifuga nuevamente y el sobrenadante se pasa a una columna de sepharosa 4B, donde se obtiene fracciones de cerca del 95 % de glucosa oxidasa con bajo contenido de catalasa. La columna se lava con un diluyente a diferentes gradientes de concentración midiendo en cada una la actividad, para saber si esta presente la glucosa oxidasa, de no ser así se traduce que lo obtenido son impurezas y no la enzima. La solución de glucosa oxidasa obtenida se precipita con sales de acridina y se centrifuga. Para eliminar el exceso de sales del sobrenadante este se pasa a una bolsa de diálisis en una solución de cloruro de sodio que por diferencia de concentración se elimina el exceso de sales, esta diálisis se repite varias veces hasta llegar al equilibrio. La solución se pasa a una cromatografía en sulfetil (SE) sephadex C-50, diluyendo con una solución de cloruro de sodio de 0-0.3 M en amortiguador de acetato de sodio a 0.008 M y pH=4.0. Se continúa con dos etapas de cromatografía en DEAE-sephadex A-50. La introducción de grupos DEAE o CM en agarosa entrecruzada da lugar a sepharosa, ésta soporta velocidades de flujo altas, por lo tanto, no se deforman en las condiciones de presión utilizadas normalmente en cromatografía y lo que es más importante no se contraen ni se hinchan cuando el pH, o la fuerza iónica de la solución cambia por lo que pueden ser regeneradas en la propia columna.

Finalmente la enzima se concentra por ultrafiltración y se mide su actividad enzimática.

La enzima purificada con esta técnica se puede utilizar para todas las aplicaciones en la industria de alimentos pero no para fines de análisis clínico. Según el requerimiento de pureza (tabla 3) la actividad de glucosa oxidasa es ≈ 200 U/ mg a $T = 25^\circ$ lo cual queda justificado al utilizar esta técnica .

CAPITULO 8

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

Una ventaja importante en la industria para utilizar el Aspergillus niger es que en los preparados comerciales contienen catalasa la cual también es producida por este microorganismo, se deben de usar juntas cuando el proceso lo requiera.

Existen también otros productores de glucosa oxidasa como se reporta en la revisión, pero no se usan ya que representan problemas de toxicidad y cuando se alcaliniza el medio provoca la inactivación de la enzima.

Para la elección del medio de cultivo se tomo en cuenta los mejores medios para la producción de glucosa oxidasa. Estos son Zetelk y Jerzy como se reporta en la tabla 14 , aquí se observa que se obtiene actividades de 1.5 y 1.8 unidades por mililitro, sin embargo, con esta última se obtiene en un tiempo mayor (48 horas), en comparación con la primera (18 horas). Por otra parte el medio Jerzy utiliza como fuente de nitrógeno fosfato ácido de amonio el cual actúa como inhibidor de la glucosa oxidasa. Por lo que se eligió el medio Zetelk dado que proporciona una buena actividad de glucosa oxidasa y utiliza poca cantidad de nutrientes para que el microorganismo se desarrolle.

Los métodos empleados en la ruptura de la célula son tres; prensa francesa, molienda con abrasivo y ultrasonificación, para su elección se tomo en cuenta la técnica donde la actividad enzimática en el extracto fuera mayor, el costo, tiempo y facilidad de operación fueran menores. La técnica que cubrió el objetivo planteado fué molienda con arena de mar. Una vez obtenido el extracto y en las etapas posteriores se mide la actividad de la enzima por el método colorimétrico por ser un método rápido, fácil y económico.

Para la purificación de la enzima de glucosa oxidasa debe emplearse el mínimo número de etapas de purificación las cuales deben ser compatibles con su uso. En la tabla 17 se observa que el costo esta en función del número de etapas de purificación y en la gráfica 4 se esquematiza que utilizando la etapas y el orden de estas son efectivas para un proceso en particular y donde se pueden obtener porcentajes elevados de purificación, y comparando la gráfica con la tabla 20 muestra que la actividad de glucosa oxidasa no se incrementa por una etapa más de purificación.

De las técnicas reportadas, la 5.15.1 y la 5.15.4 que utilizan solventes orgánicos como agentes precipitantes, los cuales deben ser usados con cuidado ya que pueden causar pérdidas irreversibles en la actividad enzimática y quizás hasta una completa desnaturalización. Por lo tanto no se recomienda su uso.

Además la técnica 5.15.1 es un procedimiento tedioso que para fines comerciales no es recomendable. Y la técnica 5.15.4 utiliza condiciones drásticas de pH además de no reportar una alta actividad (ver tabla 21).

La técnica 5.15.2 utiliza como agente precipitante sales solubles de amonio (sulfato de amonio), que contiene trazas de metales pesados que pueden inactivar a la enzima este problema se puede evitar con el uso de sulfato de amonio de grado analítico y esto repercute en el costo de proceso. Otra desventaja es que se usa a alta concentración y debe ser eliminada mediante el uso de diálisis o ultrafiltración antes de continuar con la siguiente etapa de purificación. Esta técnica es larga y utiliza acetona que tiene los inconvenientes antes mencionados además de no reportar la actividad enzimática.

La técnica 5.15.3 a pesar que emplea una combinación de métodos de purificación resulta una técnica larga que para nivel comercial no es práctica. Aquí se reporta la actividad obtenida después de cada etapa de purificación observándose que después de la segunda etapa de de purificación se obtiene una mayor actividad con un volumen menor en comparación con las etapas anteriores.

La técnica 5.15.6 propone purificar la enzima por diferentes métodos, pero a pesar de que es un procedimiento largo, la actividad enzimática reportada se esperaría que fuera alta pero esto no se ve reflejado en la tabla 21 y además de los inconvenientes arriba mencionados.

Por último, la técnica 5.15.5 propone a diferencia de las otras realizar una hidrólisis parcial para facilitar la liberación de glucosa oxidasa, cuando está se encuentra unida a otro biopolímero lo cual repercute en la obtención de la enzima en cuanto a la actividad y cantidad. La técnica utiliza una cromatografía en columna de Sepharosa que a pesar de ser costosa se ve compensada por las mayores velocidades de flujo y obteniéndose mayor capacidad de producción. Esta técnica no utiliza solventes orgánicos ni sulfato de amonio por lo que este último no interfiere en la cuantificación de proteína por el método de Biuret. Finalmente la actividad reportada por esta técnica es mayor que las demás (ver tabla 21).

CAPÍTULO 9

ANEXOS

A N E X O 1

Esporulación de la cepa

Para la esporulación de la cepa se encontró el siguiente medio:

Componente	g (%)
Glucosa	3-3.3
Maíz húmedo	0.33
o peptona Inop MC7	
Hidrolizado pancreático de caseína	0.025
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	0.010 (trazas)
o fosfato de potasio	trazas
CaCO ₃	0.400
NH ₄ NO ₃	0.025
Agar DIFCO	2.0
T =	30-34 °C
t =	6-7 días
P =	20 P.S.I.G.

[23]

A N E X O 2

Fermentación

Para la obtención del inóculo se realiza en un medio de cultivo sumergido con la siguientes condiciones y composición.

Componente	g (%)
Sacarosa	5.0
$\text{Ca} (\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.8
KH_2PO_4	0.025
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.25
Ac. cítrico monohidratado	0.075
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.001
Extracto de carne	0.10
KCl	0.025
	t = 18 horas
	pH = 4.5
	T = 28 a 30 °C

Después de la fermentación se lava el micelio con agua destilada fría.

[23]

A N E X O 3

Ruptura del micelio

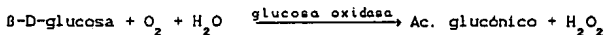
Para poder liberar la enzima se usa un método mecánico, utilizando un mortero con arena de mar, el extracto se separa del micelio por centrifugación a $1500 \times g$, durante 10 minutos a una temperatura de $4^{\circ}C$. La enzima se extrae con un buffer de fosfatos a $0.1 M$ y $pH = 5.6$.

Al sobrenadante obtenido se mide su actividad enzimática por el método colorimétrico a $530 nm$ [12]

A N E X O 4

Medición de actividad enzimática por el método colorimétrico a 530 nm.

La actividad de glucosa oxidasa se medirá por determinación colorimétrica del peróxido de hidrógeno producido en la reacción con peroxidasa y una sustancia cromógena como la *o*-dianisidina según :



Peroxidasa.

Se empleará un liofilizado comercial de grado 1 e índice de pureza 3.0 (Boehringer), y con una actividad de 144 U/mg.

Clohidrato de orto dianisidina.

Este reactivo se prepara haciendo burbujear cloruro de hidrógeno en una solución de *o*-dianisidina en benceno anhidro y posterior recristalización en metanol.

Glucosa.

Se emplea glucosa p.a. anhidra (B.D.H).

Acido sulfurico 98 % (Merck)

Glicerol (Malloinkrodt)

Peróxido de hidrógeno al 30 % (Atanor).

Reactivos.

1. Solución de peroxidasa y orto dianisidina. Peroxidasa 70 Mg/ml y clorhidrato de orto dianisidina 300 Mg/ml adicionado del 40 % de glicerol. Este reactivo puede ser utilizado durante 30 días manteniéndolo a -20°C .

2. Solución acuosa de D- glucosa 0.66 M.

3. Solución reguladora de pH, Fosfato de sodio, pH 7.0, 100 mM.

4. Acido sulfúrico 18 N.

5. Solución patrón de peróxido de hidrógeno. Se preparará por dilución 1:1000 del producto comercial. Su concentración aproximada deberá ser de 8.8 mM. Antes de realizar la curva de calibración el contenido exacto de peróxido de hidrógeno se determinará iodométricamente con una solución normalizada de tiosulfato de sodio.

6. Reactivo indicador: Se preparará en el momento de la determinación mezclando volúmenes iguales de los reactivos 1 y 3.

Para la preparación de las soluciones antes indicadas se utilizará agua bidestilada.

Técnica operativa: La medida se efectuara a 37°C en un baño termostático provisto de agitación mecánica. En un tubo de ensayo de 1.5×7.5 cm se coloca 1 ml del reactivo indicador (reactivo 6) y 0.4 ml de la solución de glucosa (reactivo 2). Se coloca en el baño termostático y una vez alcanzada la temperatura de trabajo se adicionan 0.2 ml de la solución enzimática a valorar y el sistema se agita intensamente para lograr una adecuada aeración. Transcurrido un tiempo determinado, se interrumpe la reacción mediante agregado de 1 ml de ácido sulfúrico (reactivo 4) produciéndose un color rojo estable. La absorbancia resultante se determina a 530 nm frente a un blanco donde la solución de enzima se reemplazará por igual volumen de agua bidestilada. . [24]

A N E X O 5

Método de cuantificación de proteína

Biuret

Reactivo de Biuret:

Disolver 1.5 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) y 6.0 g de tartrato de potasio sodico ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) en 500 ml de agua. Adicionar, constante agitación, 300 ml de hidróxido de sodio al 10 % (del preparado inicial de carbonato libre, 85 a 75 % de solución de hidróxido de sodio). Diluir un litro con agua, y almacenar en un botella sellada con parafina. Este reactivo puede almacenarse indefinidamente, pero debe ser descartado si, presenta contaminación o por mala preparación, este muestra signos de sedimentación de color negro o precipitado con cenizas rojizas.

La adición de 0.1 % de yoduro de potasio puede prevenir reducción excesiva y tiene un efecto no detectable en la velocidad, grado, o calidad en el color de biuret. [18,48]

Técnica a seguir :

Tubo	1	2	3	4	5	6	P
Reactivos:							
Solución estandar albúmina (8 mg/ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
Solución problema (alimento)	-	-	-	-	-	-	0.1
NaCl 0.9%	3.0	2.8	2.6	2.4	2.2	2.0	2.9
Reactivo de biuret	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

El volumen es en mililitros

P = Problema

Se agita vigorosamente.

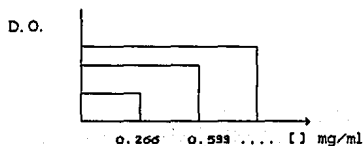
Incubar 10 minutos a 50°C.

Leer a 540 nm (densidad óptica en el espectrofotómetro)

El tubo 1 sirve para calibrar el aparato a CERO

Del tubo 2 al 6 sirve para sacar la curva estandar

Se graficará densidad óptica en el eje Y y la concentración mg/ml en el eje X.(curva estandar).



Para obtener esta gráfica se procede hacer el siguiente cálculo:

Tubo 2 :

1 ml ——— 8 mg

0.2 ml ——— X = 1.6 mg de proteína

$$\frac{1.6 \text{ mg proteína}}{6 \text{ ml}} = 0.266 \text{ mg/ml}$$

De esta manera se calcula los mg/ ml.

Tubo	mg/ml
2	0.266
3	0.533
4	0.800
5	1.066
6	1.333

Curva de calibración.

Se obtendrá empleando la técnica descrita utilizando soluciones de peróxido de hidrógeno de concentración conocida en reemplazo de la solución de glucosa oxidasa.

Nota: Se recomienda que después de cada etapa de purificación realizar la medición de actividad enzimática.

[24]

CAPITULO 10

BIBLIOGRAFIA

10. BIBLIOGRAFIA

1. Bennett E. P. Swoboda and Vincent Massey. 1965. Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. The journal of biological chemistry. Vol. 240 . No 4-6.
2. Bentley Ronald . Department of biochemistry and nutrition graduate school of public health, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania. Chapter 24. pp 567-586.
- 3.. Bentley Ronald. 1955. Carbohydrate metabolism. Methods in Enzymology. Vol. 1. Ed. Academic Press New York and London . Pág. 340 - 345.
4. Bergmeyer Ulrich Hans. 1988. Methods of Enzymatic Analysis. 3er edición. Vol. 2. Ed. Verlag Chemie.
5. Bhagavan Dr. V. 1984. Bioquímica. Ed. Interamericana. S.A. de C.V.. Segunda edición.
6. Biochemicals organic. 1990. Compounds for research and diagnostic. reagents sigma chemical company . Catálogo.
7. Bonifaz Alexandro. 1990. Micología médica básica. Ed. Francisco Mandez Cervantes. 1er edición.
8. C. Bourdillon, C. Hervagaul and D. Thomas . 1985. Increase in operational stability of immobilized glucose oxidase by the use of an artificial cosubstrate. Biotechnology and bioengineering, Vol. 27, págs. 1619-1622.

9. C. Johnson Jeanne.1977. Industrial Enzymes. Recent advances. Noyes data Corporation .
10. C.M. Brown L. Campbell.1989. Introducción a la biotecnología. Ed. Acribia S.A.
11. Cate Prescott Samuel y Cordon Dunn Cecil. 1982. Microbiología industrial. Ed. Madrid. 3er edición.
12. Certucha.Llano, Laura Elena Jorge Juan Thome Ortiz. 1979. Tesis. Consideraciones teóricas sobre la obtención de glucosa oxidasa mediante el empleo de *Aspergillus niger*. Facultad de química. UNAM.
13. Chaplin M.C and C. Bucke. 1990. Enzyme technology. Ed. Cambridge University Press.
14. Conn Eric E. y Stumpf. 1975. Bioquímica Fundamental. Ed.Limusa 2a. Edición .
15. Cor. F.B.Witteveen, Marten Veenhuis and Jaap Visser. 1992. Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. Applied and environmental microbiology. April, Vol. 58, No. 4 pág. 1190-1194.
16. Cor F.B. Witteveen, Peter VAn de Vondervoot, Klaas Swart and Jaap Visser. 1990. Glucose oxidase Overproducing and negative mutants of *Aspergillus niger*. Applied microbiology and biotechnology. Vol. 33, pag.683-686.
17. D.I. Edwards. Cromatografía principios y técnicas. 1975. Ed. Manual moderno. México. D.F.

18. Devaux Guy. 1974. Técnicas de bioquímica clínica. Edi. JIMS
Barcelona. 1^{er}. Edición
19. Dixon Malcom and C.Webb Edwin. 1979. Enzymes. Ed.
Longman. 3er.edition.
20. Dixon Malcom .1960. Enzymes.Ed.Longman 5a. Edition.
21. Diccionario de especialidades para la industria alimentaria.
1989. Ed. PLM. 1er. Edición.
22. E. Stauffer Clyde. 1989. Enzyme assay for food scientists.
Ed. New york. An Avi Book.
23. E. Voget Claudio; A. Mazza Luis y Balatti Antonio.
1988. Producción de glucosa oxidasa con *Aspergillus niger*
NRRL3. Rev. Lat. Amer. Microbol. Vol. 36, pag. 53-58.
24. E. Voget Claudio; A. Mazza Luis y Balatti Antonio. 1988.
Determinación colorimétrica de glucosa oxidasa en
preparados enzimáticos y extractos celulares. Rev. Lat.
Amer. Microbiol. Vol. 30, pag.47-52.
25. Fahey J.L. and Terry Elizabeth W. 1978.Handbook of experimental
immunology.Vol. 1 . Immunochemistry. Edited by D.M. Weir. M.D.
3er Edition.
26. Ferdinand W. 1976. The enzyme molecule. Ed. John Wiley and Sons
London-New york. Sidney Toronto.

27. Fortier Guy and Belanger Daniel . 1991. Characterization of the biochemical behavior of glucose oxidase entrapped in polypyrrole film. Biotechnology and bioengineering. Vol. 37. Pag. 854-858.

28. Freeman Bob A .1984. Tratado de microbiología de Burrows. Nueva Editorial interamericana. 21 ava. Edición.

29. Fuerst Robert. 1984. Microbiología. Ed. interamericana.

30. G. Walter William, H. Mc Bee Richard. Introducción a la microbiología. Ed. C.E.C.S.A.

31. Gacesa Peter y Hubble John. 1990. Tecnología de las enzimas. Edirorial Acribia. 2nd. Edición.

32. Gerhartz Wolfgang. 1990. Enzymes in industry production and applications. Ed. VCH.

33. Godfrey Tony, Ana Reichelf John. 1983. Industrial enzymology. The nature press. Chapter 4.20 Glucose oxidase. G. Richter.

34. Henryk M. Kalisz, Hans- jurgen Hecht, Dietmar Schomburg and Rolfd. Schmid. 1991. Effects os carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Biochimica et biophysica acta, Vol 1080 pag. 138-142.

35. Huitron Carlos. 1983 Biotechnología de las enzimas . U.N.A.M. 1 er. Edición.

36. I. Hinberg, A. Kapoulas, R. Korus, and K. O. Driscoll. 1974. Gel entrapment of enzymes: kinetic studies of immobilized glucose oxidase. Biotechnology and bioengineering. Vol. 16, pag. 159-168.
37. J. Banwart George. 1981. Basic food microbiology. Edited Avi Publishing Company, inc Westport. Connecticut.
38. J.B. Neillands, Paul K. Stumpf. 1958. Outlines of enzyme chemistry. Edited by Chapman Hall. 2nd. Edition.
39. J.Laidler Keith. 1954. Introduction to the chemistry of enzymes. Mc- Graw- Hill.
40. Johannes Pieter Van Dijken and Marten Veenhuis. 1980. Cytochemical localization of glucose oxidase in peroxisomas of *Aspergillus niger*. European Journal of applied microbiology and biotechnology Vol. 9, pag. 275-283.
41. Joklik Wolfgangk. 1986. Microbiologia. Ed. panamericana.
42. Kaoru Takegawa, Kentaro Fujiwara y otros. 1991. Primary structure of an O- linked sugar chain derived from glucose oxidase of *Aspergillus niger*. Agric. Biol. Chem. 55(3) 883-884.
43. K. Buchholz and B. Godelmann. 1978. Macrokinetics and operational stability of immolbilized glucose oxidase and catalase. Bitechnology and bioengineering Vol.20 pag. 1201-1220.
44. Kjell Kleppet. 1986. The effect of hidrogen peroxide on glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Biochemistry. Vol. 5 No.1.

45. L.A. Underkofler. 1957. Properties and applications of the fungal enzyme glucose oxidase. Proceedings of the international symposium on enzyme chemistry. Vol. 2. Edited by Pergamon Press.
46. L. Lehninger. Albert. 1989. Bioquímica. 2a. Edición. Ed. Omega S.A. Barcelona.
47. Ladisch Willson Painton e. Duilder. 1990. Protein Purification. from Molecular Mechanisms to large-scale processes. American Chemical Society. Washington D.C. . Pág. 14- 27.
48. Layne Ennis .1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in enzymology. Vol. III pag. 447-451.
49. Lin Abhangikett Vom . 1966. Das Redox potential der Glukose oxidase aus *A. niger*. pH Biochimica et biophysica acta. Enzymology and biological oxidations. Vol. 128 No 3.
50. López Munguía Agustín. 1987. Quintero Ramirez Rodolfo. Tecnología enzimática. 1er. Edición. UNAM.
51. M.Fogarty William and Catherine T. Kelly. 1985. Microbiology enzymes and biotechnology. Edited by London and New york.
52. M. Traeger, G.N. Qazi, V. Onken y otros. 1991. Contribution of endo- and exocellular glucose oxidase to gluconic acid. Production at increased dissolved oxygen concentrations. J. Chem. Tech. Biotechnol. Vol. 50, pag.1-11.

53. Margini Ricardo Anibal. 1982. Inmunología e inmuoquímica. 3a. Edición. Ed. Panamericana.
54. Markwell John , Laura G. Frakes, Eugene C. Brott y otros. 1989. *Aspergillus niger* mutants with increased glucose oxidase production. Applied microbiology and biotechnology Vol. 30, pag. 166-169.
55. Mischak Harald , Christian P. kubicek and Max Rohr. 1985. Formation and location of glucose oxidase in citric acid producing mycelia of *Aspergillus niger*. Applied microbiology and biotechnology. Vol. 21, pag. 27-31.
56. Meymar Lorenzo Jorge. 1978. Tesis. Diseño de una planta de producción de ácido glucónico. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México D.F.
57. N.C.Adrian. 1984. Microbiología. Ed. Interamericana. 2o.Edición.
58. O.R.Fennema. 1985. Food chemistry. Ed. Marcel Dekker.
59. O.R. Fennema. 1985. Introducción a la ciencia de los alimentos. Ed. Reverté S.A.
60. Osato Miyawaki and Lemuel B. Wingarf Jr.1984. Electrochemical and enzymatic activity of flavin adenine dinucleotide and glucose oxidase immobilized by adsorption on carbon. Biotechnology and bioengineering. Vol. 26, pag. 1364 - 1371.
61. Pichardo Cedeno José María .Tesis 1979. I.P.N. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Inmovilización de glucosa oxidasa para la obtención de ácido glucónico en un reactor de lecho empacado de flujo continuo.

62. Plus H.S. Tse and David A. Gough. 1987. Time- dependent inactivation of immobilized glucosase oxidase and catalase .Biotechnology and bioengineering. Vol.29, pág 705-713.
63. Prescott Dunn's. 1980. Industrial microbiology. Ed. Avi Publishing Company Inc. Westport Connecticut. 4th. Edition, pag. 693-694.
64. Quintero Ramírez Rodolfo. 1981. Ingeniería bioquímica. Ed. Alhambra. 1er edición.
65. Quirasco Baruch Maricarmen . Tesis 1990. Obtención de ácido glucónico y glucosa oxidasa por vía fermentativa. Facultad de química. UNAM.
66. Quentin H. Gibson, Benett E. P., Swoboda, and Vincent Massey, 1964. Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. The journal of biological chemical, Vol.239. No 11.
67. R. Whitaker John. 1985. Chemical Changes in food processing. Ed. Avi. Publication.
68. R. Whitaker John. 1972. Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker, Ed. Inc. New york. Vol.2.
69. Reed Gerald. 1975. Enzyme in food proccesing. New york. Ed. Academic Press.
70. Rehm H.J. And Reed G. 1987. Biotechnology. Vol.79 .Enzyme Technology. Ed. VCH.

71. Rodriguez Esparza Francisco Javier. Tesis 1975. México D. F.
Cinética de glucosa oxidasa inmovilizada en gel de poliacrilamida. I.P.N. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
72. Rogalsky Jerzy , Fiedurek Jan , Szczordrak Janusz , Kapusta Krystyna and Leonowicz Anndrzej. 1988. Optimization of glucose oxidase synthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* G- 13 mutant. Enzyme Microb. Technology. Vol. 10, august, pag. 508-511.
73. Sanner Christoph , Macheroux Peter , Jans Heinz Ruter y otros. 1991. ^{15}N - and ^{13}C - NMR investigations of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Eur.J. Biochem. Vol. 196, pag. 663-672.
74. Scope Robert K.1986. Protein Purification . Ed. Springer-Verlag New York. Heidelberg, Berlin. 4a. edition.
75. Sonnenwirth C. Alex. Jarett Leonard. 1983. Diagnóstico Clínico. Ed. Panamericana.
76. Sucko Hyaashi and Satoshi Nakamura. 1981. Multiple forms of glucose oxidase with different carbohydrate compositions. Biochimica et biophysica acta. Vol. 657, pag. 40-51.
77. Teh- Liang Chen and Hung- Shan Weng. 1986. A method for the determinations of the activity and optimal pH of glucose oxidase in an unbuffered solution. Biotechnology and bioengineering. Vol. 28, pag. 107-109.
78. Thorpe Bray James. 1970. Bioquímica. Ed. C.E.C.S.A.

79. Tsuyoshi Nakamatsu, Teiko Akamatsu, Tyuichi Miyajima and Isamu SHH.1975. Microbial production of glucose oxidase. Agr.biol.chem.,39(9) pp. 1803-1811.
80. V. Linek. P. Benes, J. Sinkule, O. Holecsek. 1980. Oxidation of D- Glucose in the presence of glucose oxidase and catalase. Biotechnology and bioengineering. Vol. 22, pag. 2515-2527.
81. United States Patent Office. 1972. No. 3,701,715. Patented oct. 31.
82. Wei-Noong Ye and Didier Combes. 1989. The relationship between the glucose oxidase subunit structure and its thermostability. Biochimica et biophysica acta , protein structure and molecular. Vol. 999, pag. 86-93.
83. West E.S. 1956. Bioquímica médica. 2o Edición.
84. Wiley John and Sons. 1974. Assay of glucose oxidase by differential conductivity. Biotechnology and bioengineering. Vol. 26. Notes to editor.
85. Willis A. Wood. 1966. Carbohydrate metabolism. Methods in enzymology. Vol. 9. Ed. Academic Press. New York and London
86. Wiseman Alan. 1985. Manual de biotecnología de los enzimas. España. Ed. Acribía. S.A.
87. W. Rippon John. 1990. Tratado de micología médica. 3er. Edición. Ed. interamericana. Mc Graw Hill.

88. Y.K.Cho. and J.E. Bailey . 1977. The influence of peroxide - stabilizing agents on enzyme deactivation by H_2O_2 . Biotechnology and bioengineering. Vol. 19, pag. 157-158.