
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCION DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA A
PARTIR DE Aspergillus niger

ROSA	IRMA	NARVAEZ	NIETO
GUADALAJARA,	JAL.,		1989

DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. JUAN MORA GALINDO

El más profundo AGRADECIMIENTO:

A Dios Nuestro Señor, por haberme dado la vida, y sembrado en mí la fé, que me ha mantenido con alegría, confianza y salud hasta hoy día.

A mi madre, que sacrificando todo por mí, logró salir adelante con esfuerzos y desvelos, en aras de la superación de su única hija. ¡ Mil gracias por tanto amor !

A los miembros de la ilustre familia Peña, de la cual me siento un poco integrante; gracias por su motivación para la realización de las grandes metas de mi vida, que poco a poco he ido alcanzando.

Al M. en C. Juan Mora Galindo, modelo de ser humano, Profesor e Investigador, que con inteligencia y disponibilidad en el trabajo asesoró atinadamente el presente Proyecto.

Al Dr. A. Paszeuski, eminente Científico del Instituto de Bioquímica y Biofísica de Varsovia, por su inapreciable ayuda en la recabación de información para la realización de este trabajo, tanto como al M. en C. Fernando García Carreño, experimentado Investigador del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (C.I.A.T.E.J.).

Al Biólogo Arturo Manzo Fontes, Investigador que con dedicación, tenacidad y criterio científico, contribuyó notablemente en la realización de este estudio.

A la M. en C. Sally Reissman, gran amiga, con amplia capacidad intelectual, que con acierto me brindó la pauta a seguir para la correcta elaboración de este escrito.

Al Dr. Jaime H. Zabiky Z. Investigador del C.I.A.T.E.J., que despertó en mí la inquietud por el saber Científico.

A los Directores del C.I.A.T.E.J., que permitieron mi desempeño como tesista, ofreciéndome para ello toda clase de facilidades.

Al Lic. Salvador Orozco M., que amablemente me auxilió en las determinaciones estadísticas que incluye el trabajo.

A todos mis amigos y compañeros, que hicieron de mi estancia en el Centro, un período de mi vida que siempre recordaré gratamente.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

G R A C I A S.

ESTA TESIS SE REALIZO EN EL CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO (C.I.A.T.E.J.) BAJO LA ASESORIA DEL BIOL. ARTURO MANZO FONTES, CON LA COLABORACION ESTRECHA DEL DR. JAIME ZABIKY Z., EL M. EN C. FERNANDO GARCIA CARREÑO, TANTO COMO EL Q.F.B. MIGUEL RAYGOSA.

I N D I C E

<u>SECCION</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAG.</u>
1.	INTRODUCCION	1
2.	ANTECEDENTES.	5
3.	JUSTIFICACION.	16
4.	HIPOTESIS.	18
5.	OBJETIVOS.	20
6.	MATERIALES Y METODOS.	23
	6.1 CEPAS DE <u>Aspergillus spp</u>	24
	6.2 MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS.	24
	6.2.1. Medio Agar-Papa-Dextrosa (PDA).	24
	6.2.2. Medio mínimo básico para <u>Aspergillus spp.</u>	24
	6.2.3. Medio mínimo con diferentes <u>con</u> centraciones de glucosa.	25
	6.2.4 Medio mínimo con 15 y 33% de - Amidex "30".	28
	6.2.5. Medio Rico para <u>Aspergillus spp.</u>	28
	6.2.6. Medio Zetelaki.	29
	6.3 CRECIMIENTO EN CAJAS DE PETRI DE LAS CEPAS FUNGICAS.	29
	6.4 CRECIMIENTO Y OBTENCION DE MICELIO EN MEDIO LIQUIDO.	31
	6.5 DETERMINACION CUALITATIVA <u>in vitro</u> DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GLUCOSA OXI DASA.	34

6.6 ENSAYO PARA LA DETERMINACION CUALITATI VA <u>in vivo</u> DE LA GLUCOSA OXIDASA. . . .	37
6.7 DESARROLLO MICELIAL, EXTRACCION Y DE-- TERMINACION CUANTITATIVA DE ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA OXIDASA EMPLEANDO MEDIO MINIMO CON AMIDEX "30" AL 15%.	39
6.8 ENSAYO CUANTITATIVO DE ACTIVIDAD ENZI- MÁTICA DE LA GLUCOSA OXIDASA <u>in vitro</u>	40
6.9 COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS CEPAS <u>A. niger</u> h-178, <u>A. niger</u> h-175 y <u>A. nidulans</u> (Pabā).	44
6.10 ENSAYO GLOBAL DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUCOSA OXIDASA <u>in vitro</u> ENPLEAN DO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO. . . .	45
6.10.1. Medios de Cultivo.	45
6.10.2. Determinación del peso seco.	47
6.10.3. Determinación de azúcares re- ductores.	48
6.10.4. Determinación cuantitativa <u>in</u> <u>vitro</u> de la actividad enzimá- tica específica de la glucosa oxidasa.	51
6.11 METODOS ESTADISTICOS PARA EL ANALISIS DE LOS RESULTADOS.	53
7. RESULTADOS.	54
7.1 COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATI- CA ESPECIFICA DE LA GLUCOSA OXIDASA -	

DE LOS EXTRACTOS DE <u>A. niger</u> h-178, <u>A. niger</u> h-175 y <u>A. nidulans</u> (Pabā) Y LA GLUCOSA OXIDASA COMERCIAL "SIGMA".	55
7.1.1. Determinación cualitativa <u>in vitro</u> de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa.	55
7.1.2 Determinación cualitativa <u>in vivo</u> de la glucosa oxidasa.	57
7.2 RENDIMIENTO MICELIAL OBTENIDO DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS (PESO SECO), PARA LA PRODUCCION DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA.	63
7.3 DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA LA PRODUCCION DE GLUCOSA OXIDASA.	66
7.4 DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA GLUCOSA OXIDASA (Q) DE LAS CEPAS <u>A. niger</u> h-175 Y <u>A. nidulans</u> (Pabā) COMPARADAS CONTRA LA GLUCOSA OXIDASA COMERCIAL "SIGMA", EMPLEANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION ENZIMATICA.	70
8. DISCUSION Y CONCLUSIONES.	80
9. BIBLIOGRAFIA.	91
10. ANEXOS	98
10.1 CARTA DE ACEPTACION DEL PROYECTO DE <u>TE</u>	

	<u>PAG</u>
SIS.	99
10.2 CARTA DEL VISTO BUENO DEL DIRECTOR DE	
TESIS.	100

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

Un país como el nuestro, que enfrenta una crisis económica severa, requiere apoyarse en todas las áreas de desarrollo factibles; una de ellas es el empleo de la Biotecnología.

La Biotecnología consiste en técnicas y procesos cuyo fin estriba inminentemente en la obtención de compuestos útiles para el desarrollo del país, bien sea en el área agroalimenticia, médica, farmacéutica y de ingeniería química.

La Biotecnología se basa en conocimientos biológicos extensos y técnicas de producción industrial; los recursos con que cuenta para lograr su objetivo son, entre otros muchos: los métodos de ingeniería genética (Acido Desoxirribonucleico o A.D.N. recombinante), el cultivo de células in vitro y la tecnología enzimática. Las materias primas más utilizadas en los procesos biotecnológicos son principalmente los microorganismos (bacterias y hongos), aunque también se emplean vegetales y animales superiores. Todos ellos poseen la capacidad de sintetizar compuestos de interés comercial, tales como enzimas, hormonas, anticuerpos y ácidos orgánicos, entre otros.

Los microorganismos, principalmente bacterias y hongos, poseen además la ventaja de poder cultivarse y mantenerse en condiciones óptimas con relativa facilidad en el laboratorio.

Los hongos filamentosos han sido empleados para la producción de compuestos de gran interés en la industria, ejemplos de ellos son: Penicillium camembertii (utilizado en la-

elaboración del queso), Penicillium chrysogenum (productor de penicilina), Aspergillus orizae (síntesis de α -amilasa), Trichoderma viride (en la elaboración de celulasas), y preponderantemente, diversas cepas de Aspergillus niger para la producción de ácido cítrico, amiloglucosidasa, proteasas y glucosa oxidasa.

Aspergillus niger particularmente, puede ser cultivado en gran escala para la elaboración de glucosa oxidasa, producto normal en su cadena metabólica. La glucosa oxidasa es una enzima con actividad relevante en la transformación de la glucosa a ácido glucónico, reacción de interés en la industria alimenticia y farmacéutica para la eliminación y detección de glucosa, respectivamente.

Por métodos de la Tecnología enzimática, es posible extraer, aislar y purificar esta enzima, muy útil en la industria alimenticia, ya que permite la conservación de productos como la mayonesa, vinos y bebidas; además del huevo en polvo. Es requerida también, en la industria farmacéutica para la detección de glucosa en fluidos corporales.

El presente proyecto consiste en el desarrollo a nivel de laboratorio de un medio de cultivo para la producción a escala industrial de glucosa oxidasa, a partir de Aspergillus niger, empleando como fuente de carbono e inductor de la enzima el compuesto comercial Amidex "30" (producto de la hidrólisis parcial del almidón, consistente en dextrinas y equivalentes

tes de dextrosa libres). El Amidex "30" es un posible sustituto de glucosa o sacarosa convencionalmente empleada para cultivar al microorganismo en cuestión, sirviendo además como inductor para la síntesis de la enzima glucosa oxidasa.

2. ANTECEDENTES

Los procesos Biotecnológicos en el área de microbiología y fermentaciones han venido desarrollándose desde que el hombre comenzó a aprovechar la capacidad de ciertos microorganismos (aún sin darse plena cuenta de ello) para la obtención de quesos y bebidas por medio de la fermentación. De la misma forma se realizaban, en base a observaciones previas, técnicas rudimentarias inmunológicas teniendo como finalidad el control de las enfermedades infecciosas que los afectaban (1).

La Biotecnología ha sido definida de diversas formas (1-3), entre ellas, un concepto concluyente es el que propone que la Biotecnología son técnicas comerciales que emplean organismos vivos u otras sustancias derivadas de los mismos que incluyen el uso de procedimientos para el mejoramiento de las características de importancia económica de plantas y animales (3). La Biotecnología moderna recurre a técnicas biológicas actuales tales como:

- Técnicas de ADN recombinante.
- Técnicas de cultivo y fusiones celulares in vitro, y
- Tecnología enzimática, entre otras muchas.

Dentro de la Biotecnología, preponderantemente, la Tecnología enzimática logra la producción de enzimas a gran escala, su purificación y estabilización, tanto como la aplicación idónea de estos catalizadores biológicos obtenidos prin-

principalmente a partir de microorganismos (4).

Algunas veces la purificación de las enzimas es requerida en alto grado (generalmente en aplicación clínica), sin embargo, para otros usos no importa demasiado si va combinada con otras moléculas.

Las enzimas pueden ser empleadas en varias industrias; estos usos están determinados por su especificidad, estabilidad, actividad, disponibilidad y costo de producción (4). Las industrias que requieren de estos productos (enzimas) son por mencionar algunas: la alimenticia (5), textil (5), papelera (5), química (5), y en la analítica (6), incluyendo en esta última el empleo clínico o farmacéutico.

Hoy en día, la inmovilización de las enzimas resulta muy efectiva, lográndose así acoplar a equipos conocidos como "biorreactores" o para la construcción de sensores o electrodos biológicos (4,5,7).

Una de las enzimas que destaca en importancia por su gran aplicabilidad industrial actual, es la glucosa oxidasa (GO), también llamada en el transcurso del tiempo: notatina (8), penicilina B (8), o glucosa aerodehidrogenasa (9), y designada correctamente por la Comisión de enzimas (10-12) como β -D - glucosa - O_2 - oxidorreductasa; E.C. 1.1.3.4.

La glucosa oxidasa ha sido aislada a partir de innumerables fuentes; su descubridor fué Müller en 1928, y se ha iden

tificado en extractos de Aspergillus niger (4,8,12-18), Penicillium glaucum (8,10,15,18), Penicillium notatum (4,14,16, 18,19), P. amagasakiense (13,15,17-19), P. purpurogenum (18). Se ha reportado glucosa oxidasa de bacterias (10,20); también ha sido purificada de miel de abeja (11), algas rojas (11-15) y recientemente del basidiomyceto Phanerochaete chrysosporium (21).

La glucosa oxidasa ha sido objeto de diversos estudios, logrando determinar algunas de sus propiedades físico-químicas, además de su cinética enzimática (8,15-20). Los reportes de dichos trabajos se concentran en la glucosa oxidasa de Aspergillus niger, considerada como la mejor especie productora. La enzima glucosa oxidasa es una flavo-glico-proteína con peso molecular de 160,000 daltons, constituida por dos subunidades idénticas (13,15,19). Concretamente posee dos moléculas de Flavín-adenín-dinucleótido (FAD) por molécula de enzima (21).

CINETICA DE LA ENZIMA. La glucosa oxidasa (β -D - glu-
cosa- O_2 - oxidorreductasa E.C. 1.1.3.4.) cataliza la oxidación de la β -D - glucosa a δ -D - glucono- δ - lactona en presencia de oxígeno molecular, obteniendo como productos peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y D - ácido glucónico por hidrólisis "no enzimática" del δ -D - glucono - δ - lactona (8,15,-21). La reacción catalizada (9,18) se esquematiza en la figura 1.

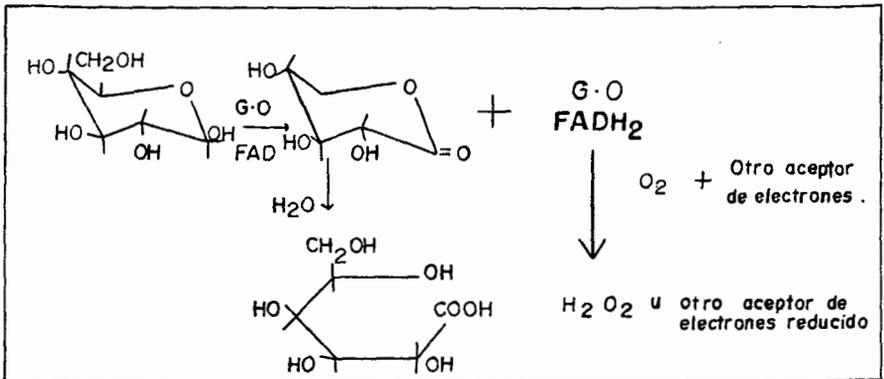


Fig. 1. Esquema de la reacción que cataliza la enzima glucosa oxidasa. La GO utiliza como sustratos glucosa, oxígeno molecular y agua para producir ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). G: β -D-Glucosa; L: β -D-Glucolactona; GO: Glucosa oxidasa y FAD: Flavín-adenín dinucleótido.

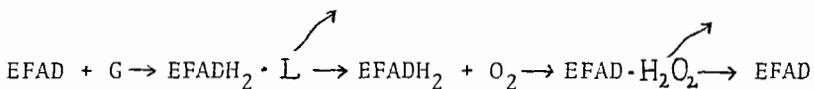


Fig. 2. Diagrama de la transformación en la que interviene la glucosa oxidasa. El mecanismo de reacción es el mismo de la Fig. 1. Las abreviaturas corresponden a: G: β -D-Glucosa; L: β -D-Glucolactona; GO: Glucosa oxidasa, EFAD: glucosa oxidasa oxidada, EFADH₂: glucosa oxidasa reducida; O₂: oxígeno molecular y H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

La glucosa oxidasa es altamente específica para la glucosa en su forma β -D-glucopiranososa (9 y 15).

Otra forma de mostrar el mecanismo de acción de la glucosa oxidasa es el que se expone en la figura 2 (9).

La reacción que cataliza la glucosa-oxidasa se manifiesta entonces como una reacción enzimática de segundo orden, según la descripción del modelo de Michaelis-Menten para el caso de dos sustratos (16 y 18).

USOS DE LA GLUCOSA OXIDASA. La glucosa oxidasa, reviste gran importancia económica en la actualidad, debido a la reacción que cataliza (como se describió anteriormente), con uso relevante de la industria alimenticia y farmacéutica (17):

- I. Se emplea en la eliminación de la glucosa, principalmente de la clara y yema de huevo durante el proceso de elaboración de huevo en polvo, ya que el 5% de la glucosa que posee, puede causar un oscurecimiento indeseable (Reacción de Maillard) durante períodos de almacenamiento prolongados. GO combinada con catalasa, elimina también el H_2O_2 presente en el producto.
- II. Eliminación de oxígeno. La glucosa oxidasa por ser antioxidante previene los cambios de color y sabor (enranciamiento) en los alimentos durante el procesamiento y conservación de:

- Jugos cítricos y bebidas carbonatadas.
- Jugos dulces (néctares)
- Leche en polvo
- Vinos (blanco y rosado) y cervezas
- Mayonesa y aderezos salados
- Varias combinaciones de la glucosa oxidasa con ácido ascórbico, celulasas y lactosa, entre otras, participan en la conservación óptima de diversos comestibles.

III. En el área farmacéutica la GO es usada en diagnóstico clínico como fiel indicador del metabolismo de carbohidratos en fluidos corporales (4,15,17). Productos comerciales de glucosa oxidasa permiten la determinación cuantitativa directa de glucosa en suero y plasma (22).

IV. Ultimamente se trabaja en la inmovilización de GO en diferentes soportes (orgánicos e inorgánicos), logrando la utilización al máximo de la enzima, en procesos fermentativos continuos o en Batch (lote); además de la elaboración de electrodos biológicos (7, 23-31).

En la mayoría de los estudios citados, se obtiene la glucosa oxidasa a partir del hongo Aspergillus niger. A. niger, pertenece a la subdivisión Ascomycotina y a la clase de los Plectomycetes; es un hongo que se desarrolla en colonias que se extienden rápidamente, y cuya coloración micelial se torna blanca-amarilla-marrón y negra. Presenta conidios globosos

y radiados, constituyendo columnas sobre el sustrato (32-34).

El hongo A. nidulans por su parte, es de uso común en estudios genéticos, crece generalmente aislado, liso, aterciopelado y de color verde claro, presentando una escasa producción conidial, y que para los fines del presente trabajo, también fué utilizado (33).

Tanto A. niger como A. nidulans, pueden ser desarrollados en medios de cultivo determinados, resultantes de una mezcla de materiales orgánicos e inorgánicos (3,33).

Específicamente para el crecimiento de A. niger y la producción de la enzima glucosa oxidasa, se han reportado diversos medios de cultivo.

La patente de Goldsmith en 1960 (20), revela solamente el crecimiento de A. niger en un medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono e inductora de la síntesis de G.O. En 1980 en un estudio para la localización citoquímica de la glucosa oxidasa en A. niger, se empleó ya, un medio mineral a base de Glucosa, Hidrocloruro de Metilamina y varias sales como Sulfato de Magnesio ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$), Sulfato de Potasio (K_2SO_4) Sulfato de Zinc ($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$) y Sulfato de Hierro ($FeSO_4 \cdot 7 H_2O$), además de extracto de levadura.

En el mismo año, la publicación Barker, S.A. (1980), se-

ñala un medio para el crecimiento fúngico de Zetelaki (1970), cuyos componentes son: Sacarosa en gran cantidad, Licor de maíz y Nitrato de Calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como fuente de nitrógeno y complementos de Acido Cítrico, Fosfato de Potasio (KH_2PO_4), Cloruro de Potasio (KCl), Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), así como Cloruro de Hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (15). Esta publicación destaca a la agitación y aereación como factores importantes para la producción de GO, señalando también que la actividad GO fué alta en un medio con 5% de azúcar (glucosa) y no incrementó considerablemente al aumentar un 7% (15).

Fogarty (1983) en el libro *Microbial Enzymes and Biotechnology* indica que el medio de cultivo utilizado para la producción de la enzima es muy simple, a base de Glucosa, Melazas, Licor de Maíz o peptona, sales adicionales y minerales traza (18).

La publicación de Fiedurek, J. en 1986 sobre mutagénesis fúngica para la producción de glucosa oxidasa por A. niger describe un medio consistente en, Glucosa en gran proporción y Carbonato de Calcio (CaCO_3), ambas como fuentes de carbono, en tanto que para el suministro de nitrógeno se utiliza Peptona, incluyendo por supuesto sales minerales como Fosfato de Amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$), Fosfato de Potasio (KH_2PO_4) y Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (12).

Del análisis de los cultivos antes expuestos, se concluye la importancia en el medio, de una fuente de carbono y una de nitrógeno, además de sales minerales en pequeñas concentraciones.

El presente proyecto establece la implementación de un medio de cultivo, substituyendo la fuente de carbono ordinaria (glucosa o sacarosa) por el compuesto comercial Amidex "30", empleado por primera vez para la producción de la enzima glucosa oxidasa, que como se ha venido enunciando, resulta de gran utilidad en la industria alimenticia y farmacéutica.

Las ventajas que ofrece el Amidex "30" (producto de la hidrólisis parcial del almidón que contiene 30% de equivalentes de dextrosa libres y dextrinas (polímeros de glucosa) son:

1. La relativa facilidad de adquisición del producto, por su bajo costo en el mercado local, a diferencia de la glucosa o sacarosa en grado reactivo, que ostenta un alto precio comercial; y en un proyecto de escalamiento, el factor económico, obviamente, es de suma importancia.
2. La composición propia del Amidex: 30% de equivalentes de dextrosa libres y dextrinas, resultado de la hidrólisis parcial del almidón, suministra al medio de cultivo la cantidad de dextrosa (o glucosa) necesaria tanto para el crecimiento vegetativo del hongo; como en la inducción

de la síntesis de la enzima glucosa oxidasa, producto que nos ocupa.

3. El desdoblamiento gradual (ulterior) de las dextrinas del medio, durante el crecimiento del hongo, provee de una cantidad adicional de glucosa al cultivo, evitando su agotamiento.
4. Disminuye el problema de contaminación del cultivo, al suprimir el uso del licor de maíz, propuesto en uno de los medios reportados en la bibliografía (15).

El desarrollo de un medio de cultivo para la producción de glucosa oxidasa a partir de Aspergillus niger, contribuirá como alternativa en la producción de tan importante enzima, ya que al escalar el proceso para la obtención, purificación e inmovilización de la enzima, se tornará más accesible la síntesis en el país, contribuyendo al adelanto científico y tecnológico de México.

2

3. JUSTIFICACION

Trabajos biotecnológicos como el "Desarrollo de un medio de cultivo para la obtención de la enzima glucosa oxidasa a partir de Aspergillus niger , entre otros, que se realizan en México, contribuyen a disminuir notablemente el nivel de importación de un sinnúmero de productos o materias primas.

Concretamente, la importancia de substituir la fuente de carbono convencional (glucosa o sacarosa reportada por diversos autores) por el compuesto comercial Amidex "30", radica fundamentalmente, en la facilidad con que es posible adquirirlo, a bajo costo en el mercado; a diferencia de la glucosa sacarosa en grado reactivo. Esto representa una marcada reducción en el gasto de producción durante el proceso de escalamiento a nivel industrial para la obtención de la enzima glucosa oxidasa.

4. H I P O T E S I S

La producción de glucosa-oxidasa a partir del Ascomyceto Aspergillus niger será favorecida cuando al medio de cultivo se le substituye la fuente de carbono tradicional (glucosa o sacarosa) por el compuesto comercial Amidex "50".

5. OBJETIVOS

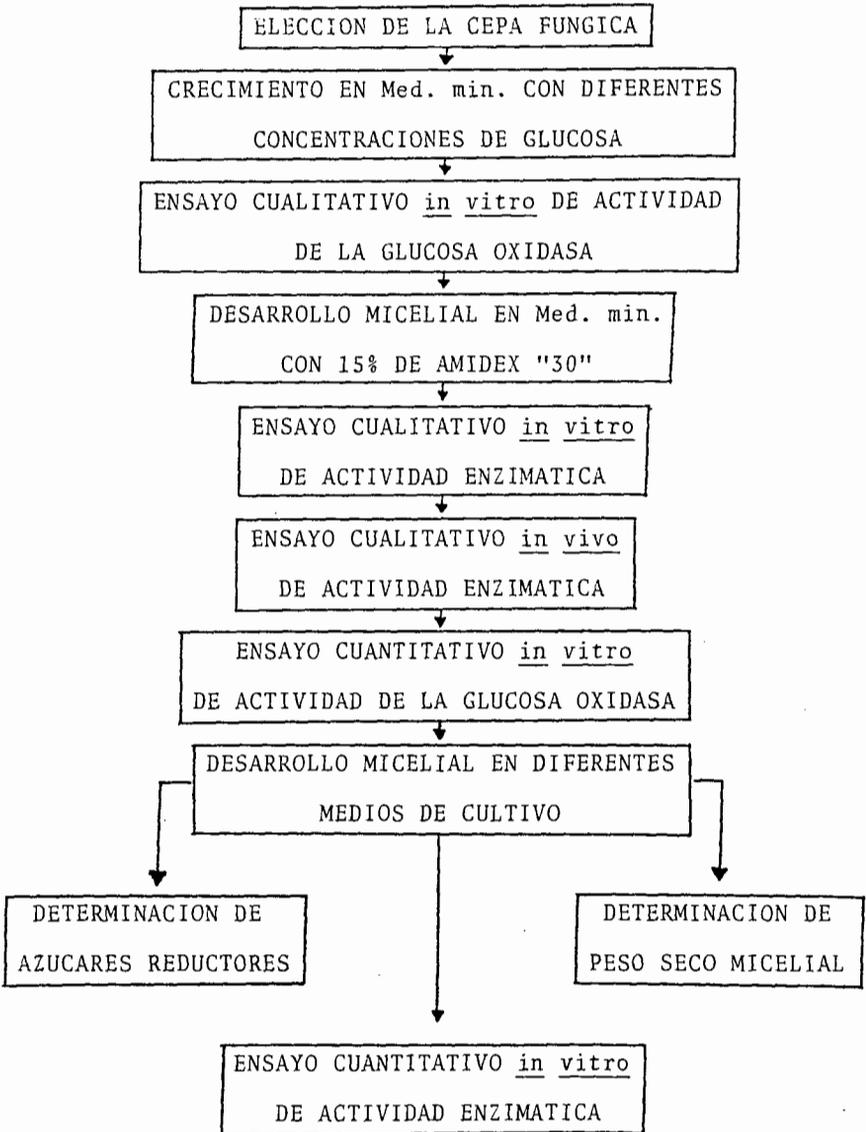
OBJETIVO GENERAL:

Implementar un medio de cultivo para la producción de glucosa-oxidasa utilizando el compuesto comercial Amidex "30" como inductor de la enzima en Aspergillus niger.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Desarrollar un método de ensayo in vivo para la detección cualitativa de actividad de glucosa-oxidasa en A. niger.
2. Determinar cualitativamente la actividad de Glucosa-oxidasa de A. niger en extractos del microorganismo.
3. Seleccionar la estrategia de extracción más apropiada para la obtención de extractos enzimáticos a evaluar.
4. Cuantificar in vitro la actividad específica de glucosa-oxidasa de Aspergillus niger crecido en diferentes medios, comparándola con la enzima comercial (pura) y la actividad enzimática de Aspergillus nidulans(pabā).

D I A G R A M A D E F L U J O



6. MATERIALES Y METODOS

c

6.1 CEPAS DE ASPERGILLUS SPP.

Las cepas fúngicas elegidas en la experimentación fueron:

Aspergillus niger h-178 (ATCC-10864, NRRL-330); que es un organismo reportado como productor de enzimas sacarofílicas y glucoamilasa (35).

Aspergillus niger h-175 (ATCC-9029, NRRL-003), productor de ácido glucónico y glucosa oxidasa (35).

Aspergillus nidulans (Pabā), auxotrófica para el ácido p-amino-benzoico, que se utilizó como control negativo en los experimentos, ya que ha sido comprobada en esta cepa, una baja síntesis de glucosa oxidasa (12).

6.2 MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS:

Los medios de cultivo empleados fueron:

6.2.1 Medio Agar-Papa-Dextrosa (PDA) adicionado con 0.5% de extracto de levadura (Merk), este medio se conoce como medio rico; recomendado para el crecimiento en caja de Petri de las cepas fúngicas antes mencionadas, al estimular la conidiación y esporulación de Aspergillus (33,35).

6.2.2 El medio de cultivo mayormente utilizado fue el Medio mínimo básico para Aspergillus spp. (Med. min)

descrito por el Dr. A. Paszeuski, comunicación personal; cuyos componentes se enlistan en la Tabla No. 1. A partir de este medio se ensayaron variaciones en las concentraciones de la fuente de carbono (glucosa), responsable indudablemente, de un mejor crecimiento micelial y/o una mayor actividad glucosa oxidasa (12,15,18,20).

6.2.3 Medio mínimo básico para Aspergillus spp. (Med. min) fue modificado en sus concentraciones normales de glucosa, es decir, el 1% que incluye (ver tabla 1), por 5, 10, 20 y 40% (gramos de glucosa por cada 100 mililitros de medio), tal como se expresa en la Tabla 2.

Siempre que se llevó a cabo el crecimiento de A. nidulans (Pabā) fué necesaria la adición al Med. min. de una solución de Acido p-amino-benzoico (Pa ba) al 0.00001%, esterilizada por filtración con equipo Millipore a presión, en el que se utilizaron membranas con poros de 0.45 μm de diámetro. La solución de Paba fué conservada a 4°C hasta su empleo. Los medios de cultivo ricos no requieren este suplemento.

En virtud de que las concentraciones de glucosa requeridas (según nuestros resultados) fueron altas, y por el hecho de que al escalar este proceso aumen

TABLA 1. COMPONENTES DEL MEDIO MINIMO BASICO PARA Aspergillus spp. OBTENIDO POR COMUNICACION PERSONAL DEL DR. AL PASZEUSKI.

REACTIVO	CONCENTRACION (g/l)
NaNO_3	6
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	10
KCl	0.52
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.52
KH_2PO_4	1.52
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0004
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0008
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0008
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0008
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0008

El medio mínimo básico para Aspergillus spp. fue ajustado a un pH de 6.5 con una solución 1 M de Hidróxido de Sodio. Posteriormente fué sometido a esterilización a 15 libras de presión durante 15 minutos, de tal forma que al enfriarse queda se listo para ser inoculado con los hongos a ensayar.

TABLA 2. MODIFICACIONES REALIZADAS AL MEDIO MINIMO BASICO PARA Aspergillus spp. CON RESPECTO A LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EMPLEADA.

MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACION DE GLUCOSA (%)
Med. Min.	1
" "	5
" "	10
" "	20
" "	40

Medios de cultivo desarrollados para verificar diferencias en la actividad glucosa-oxidasa de los micelios obtenidos, luego de 24 y 48 horas de crecimiento.

ta aún más dicha cantidad de glucosa, se empleó como sustituto de la misma, el compuesto comercial Amidex "30".

6.2.4 Se desarrollaron cultivos de Med. Min. sin glucosa, pero suplementado con Amidex "30" al 15 y 33% para igualar las cantidades de glucosa antes descritas (Tabla 2), logrando concentraciones de equivalentes de Dextrosa libres de 4.5 y 10% respectivamente en medios separados.

6.2.5 Para comparar actividad enzimática de las cepas fúngicas se emplearon además el Medio Rico para Aspergillus spp. descrito por el Dr. A. Paszeuski (comunicación personal) que es el propio Medio mínimo básico para Aspergillus spp. enriquecido con 6 g/l de extracto de levadura y 20 ml. de solución de aminoácidos por litro de medio.

La solución de aminoácidos compuesta por fenilalanina, prolina y metionina al 1% se esterilizó con equipo Millipore filtrando a presión a través de membranas con poros de $0.45 \mu\text{m}$ de diámetro, (conservación a 4°C), incorporándose al medio de cultivo una vez que éste fue esterilizado en la autoclave, esperando a que se enfriaran, para evitar que los aminoácidos fueran degradados por acción del calor.

El pH del medio de cultivo fué ajustado a 6.5 (comunicación personal del Dr. A. Paszeuski) con hidróxido de sodio antes de ser sometido a esterilización en autoclave durante 15 min. a 15 libras de presión.

En virtud de que el Medio Rico contiene sólo 1% de glucosa, también se preparó uno, pero con 10% de la misma, estimulando la síntesis de glucosa oxidasa (12,15,18,20; ver detalles en las secciones posteriores).

6.2.6 Finalmente fué considerado durante la experimentación el Medio Zetelaki, reportado en la literatura para la obtención de la enzima glucosa oxidasa (15). Sus componentes químicos y condiciones de cultivo desarrolladas, se describen en la Tabla 3.

6.3 CRECIMIENTO EN CAJAS DE PETRI DE LAS CEPAS FUNGICAS.

Para iniciar el desarrollo de una cepa fúngica se pueden emplear medios de cultivo sólidos en cajas de Petri, con medio rico, que permita una perfecta conidiación (33,35). Por tal motivo, se crecieron las cepas de A. niger h-178 (primera cepa disponible) y A. nidulans (Pabā) en Medio Agar-papa-Dextrosa (PDA) (35), adicionado con 0.5% de Extracto de Levadura.

Para preparar el PDA se disolvieron 39 gramos del propio

TABLA 3. COMPOSICION QUIMICA Y CONDICIONES DE CULTIVO DEL MEDIO ZETELAKI (15).

REACTIVO	CONCENTRACION g/l
Sacarosa	50
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2
Acido cítrico	7.5
KH_2PO_4	0.25
KCl	0.25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01
Licor de maíz saturado	20

El medio inoculado con el hongo fué incubado a 37°C y 300 rpm durante 24 y 48 horas.

reactivo por cada litro de agua destilada en un matraz Erlenmeyer, adicionándole 0.5% de extracto de levadura, posteriormente se fundió el agar en baño maría, luego de lo cual fué sometido a esterilización en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Subsecuentemente fué vertido el medio a cajas de Petri estériles, hasta que el medio solidificara a temperatura ambiente.

La inoculación fúngica se realizó por picadura con el asa de inoculación esterilizada en la flama del mechero, enfriándose después unos instantes.

De la colección de cepas se tomó un poco de muestra con ayuda del asa, tanto de la cepa A. niger h-178 como de A. nidulans (Pabā) por separado, inoculándolas en un solo punto al centro de la caja de Petri con medio PDA.

Para el crecimiento del hongo, las cajas de Petri se colocaron en la incubadora a 37°C (35) durante una semana aproximadamente, o hasta que el micelio hubiera invadido totalmente la extensión del medio en perfecta conidiación.

6.4 CRECIMIENTO Y OBTENCION DE MICELIO EN MEDIO LIQUIDO.

Para la determinación de la Actividad glucosa-oxidasa de las cepas fúngicas empleadas, fué necesario obtener el micelio crecido en matraces con medio líquido (33).

El usado en primer término fué el Medio mínimo básico pa-

ra Aspergillus spp. (ver Tabla 1 de la sección 6.2), cuya concentración de glucosa es de 1%; ensayando luego variaciones con 5,10,20 y 40% de glucosa (12,15,18,20), en medios por separado (ver sección 6.2.2 y 6.2.3). Para ello fué indispensable contar previamente, con cajas de Petri (de PDA) con las cepas en conidiación perfecta (33 y 35).

El Med. Min. fué preparado disolviendo cada uno de los reactivos (ver tabla 1) y en el orden señalado, en un volumen de agua destilada tal, que no rebasase luego la cantidad de medio deseado. Es decir, si se necesitaban 300 mililitros de Med. min., bastó colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 o 1000 ml. de capacidad, solamente 100 ml. de agua destilada, incorporando posteriormente uno a uno los reactivos requeridos. Específicamente, en el medio con 40% de glucosa, ésta fué agregada (120 g) y disuelta, después de lo cual se determinó y ajustó el pH a 6.5, aforando finalmente a 300 ml. con más agua destilada.

Se colocó el medio en matraces Erlenmeyer cuya capacidad rebasó ampliamente el volumen del líquido, con lo que se favoreció la agitación y aereación, aspectos muy importantes para la síntesis de glucosa oxidasa (15).

Los medios se esterilizaron en la autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos (33), junto con frascos con tapa de rosca de 25 ml. de capacidad aproximadamente, conteniendo

9 ml. de solución de Tween "20" (reactivo) al 0.01%, éste es un detergente que evita la congregación de las esporas y conidios fúngicos.

Al salir el material de la autoclave, se dejó enfriar, en tanto que en una campana de extracción de aire y cerca de un mechero de alcohol, se procedió al raspado de las cajas de Petri con PDA y las cepas A. niger h-178 y A. nidulans (Pabā) bien desarrolladas. El raspado de las cajas fué efectuado con ayuda de una espátula previamente esterilizada al fuego, y enfriándola en alcohol o en solución del mismo Tween. Se utilizó la mitad de una caja de A. niger h-178 para un frasco con 9 ml. de Tween; y una caja completa de A. nidulans (Pabā), esto último debido a que su conidación aparece siempre menos densa (comunicación personal Dr. A. Paszeuski).

Los frascos pequeños conteniendo ya el inóculo de ambas cepas (33), fueron mezcladas perfectamente en agitador "Vortex" y vertidas posteriormente a los matraces Erlenmeyer con los medios de cultivo.

Como ya se explicó en la sección 6.2.3, los cultivos con A. nidulans (Pabā) requieren la adición de 1% de la solución de Acido p-amino-benzoico al 0.001% (ver sección 6.2.3). Después de ejecutado lo anterior, se colocaron los matraces en el orbital a 37°C y 300 rpm durante 24 (15) y 48 horas (comunicación personal Dr. A. Paszeuski).

La colecta del micelio se realizó filtrándolo con seda y lavándolo perfectamente con agua destilada en un embudo, hasta eliminar totalmente el medio de cultivo. Se exprimió el micelio con toallas de papel absorbente, obteniendo una "pastilla" como muestra para el ensayo de actividad de la glucosa oxidasa.

6.5 DETERMINACION CUALITATIVA in vitro DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GLUCOSA OXIDASA.

Para la determinación de actividad enzimática de la glucosa oxidasa hubo que tomar en cuenta que se trata de una enzima intracelular (14) y por tanto, para su extracción, el micelio debe ser sometido a un método drástico de ruptura celular. En la literatura se reportan diversos métodos de extracción (4,17,18,21), pero todos coinciden en la lesión de la pared celular del hongo, liberando así su contenido citoplásmico.

En este estudio se optó por la maceración del micelio, tal operación fué realizada colocando de 2 a 5 g (peso húmedo) de micelio congelado (-20°C) en un mortero. Posteriormente se incorporó un poco de vidrio molido, así como una pequeña cantidad de nitrógeno líquido (10 ml. aprox.) (dicha combinación facilita aún más el daño celular 4,17,21), después de lo cual se dejaron transcurrir unos cuantos segundos para que se evaporara el nitrógeno líquido, golpeando fuertemente el micelio en

el mortero con el mazo. Esta operación se realizó por tripli-
cado.

La muestra así tratada se resuspendió en una dilución
1:5 (1 g. de micelio en 5 ml. de solución amortiguadora) con
solución amortiguadora de fosfato-citrato $2.5 \times 10^{-4}M$ y a un
pH de 5.6. La resuspensión se conservó en hielo para evitar
acción de proteasas provenientes de la misma muestra.

Posteriormente se mezcló en el agitador "Vortex", proce-
diendo por último a su filtración por presión con equipo Mi-
llipore en membranas con poros de $0.45 \mu m$ de diámetro, para
eliminar el micelio lesionado y así obtener el extracto enzi-
mático en el sobrenadante.

El reactivo empleado para la determinación de la activi-
dad enzimática de la glucosa oxidasa fué el 2-6 diclorofenol-
idofenol (2-6 diClØ indoØ), un cromógeno que en condiciones
anaeróbicas substituye al oxígeno en la reacción que cataliza
la glucosa oxidasa con lo cual sufre extinción en su color ca-
racterístico, virando de azul intenso a incoloro (8,15,21).

Este método fué elegido entre otros reportados (9,10,12,
13,17,21), por el hecho de no interferir en la reacción nor-
mal, la presencia de otras enzimas (i.e. como la catalasa) que
comunmente alteran la reacción enzimática en el extracto de A.
niger h-178 y A. nidulans (Pabā) a ensayar.

Para muestras enzimáticas con un grado de purificación mayor es preferible el empleo del ensayo acoplado a Peroxidasa, utilizando O-Dianisidina (10,12,13,21).

La preparación del 2-6 diCl θ indo θ mas el sustrato (glucosa) se efectuó de la siguiente manera: el cromógeno (2-6 diCl θ indo θ) fué disuelto en amortiguador fosfato-citrato $2.5 \times 10^{-4} M$, a pH 5.6 a una concentración de 5 mM. Esta se diluyó 1:10 con amortiguador, agregando luego glucosa anhidra en razón de 0.277 M (concentración adecuada según el K_M de la glucosa por la enzima) (17,20).

Como la coloración de la solución fué aún muy intensa, se diluyó nuevamente 1:10, resultando así adecuada para el ensayo (36).

Como control positivo de actividad enzimática se empleó una solución de glucosa oxidasa comercial (β -D Glucosa: Oxígeno 1-Oxido-reductasa: E.C. 1.1.3.4, purificada también a partir de A. niger, tipo II obtenido de Sigma Chemical Company) con 3 mg/ml en amortiguador fosfato-citrato $2.5 \times 10^{-4} M$ pH 5.6.

A tubos de ensayo pequeños, se les incorporó 1 ml. de la solución antes preparada, del 2-6 diCl θ indo θ y glucosa, para adicionarles luego cantidades variables (de 30 a 100 μ l) de cada uno de los extractos obtenidos, y de la solución de glucosa oxidasa comercial, por separado con ayuda de una micropipeta

Gilson pipetman. Se agitaron perfectamente los tubos de ensayo y se esperó el tiempo suficiente para que se efectuase la reacción colorimétrica (viraje de azul a incoloro).

6.6 ENSAYO PARA LA DETERMINACION CUALITATIVA in vivo DE LA GLUCOSA OXIDASA.

Con el objeto de observar la actividad enzimática de la glucosa oxidasa, no de un extracto fúngico (método bastante drástico) sino directamente del micelio del hongo; se llevó a cabo el ensayo in vivo para la determinación cualitativa de actividad enzimática de la glucosa oxidasa (37).

Para ello, primero se preparó Medio mínimo básico para Aspergillus spp; pero substituyéndo la glucosa (grado reactivo) requerida (5% según el ensayo expuesto en la sección 6.4 y 6.5, para el crecimiento e inducción enzimática del hongo) por el compuesto comercial Amidex "30" (ver más detalles en la sección 6.4).

Para lograr la equivalencia en concentración de dextrosa (glucosa) se le adicionó al Med. min. 15% de Amidex "30" y 1.5% de Agar-agar. Dicho medio se esterilizó en la autoclave durante 15 min. a 15 lb. de presión (34), después de lo cual se dejó enfriar un poco, para añadir 1% de la solución de ácido para-amino-benzoico 0.00001% (ver la sección 6.2.3), vertiendo finalmente el medio en cajas de Petri y esperando a que solidificara el agar.

Se inocularon A. niger h-178 y A. nidulans (Pabā) en tres puntos por caja para cada una de las cepas (consultar la sección 6.3), y finalmente fueron colocadas en incubación a 37°C durante 40 horas aproximadamente, tiempo suficiente para observar el desarrollo conidial requerido para el ensayo.

A dichas cajas de Petri, se les incorporó de 5 a 10 ml de tolueno, solvente que daña las paredes celulares del hongo haciéndolas permeables. Con este fin se probaron diferentes tiempos de exposición, que variaron de 1 a 5 minutos; el último de los cuales fue el más idóneo (37).

Posteriormente se descartó el tolueno, y se eliminaron restos del mismo con tres o más lavados de amortiguador fosfato-citrato 2.5×10^{-4} M, pH 5.6.

Fué indispensable la previa preparación de una solución de 2-6 diClóindoø (8,15 y 21) 0.005 M en amortiguador fosfato-citrato 2.5×10^{-4} M, pH 5.6, diluyéndola posteriormente con 1:10 de amortiguador; a la cual se le agregó 0.277 M de glucosa anhidra (consultar la sección 6.5). Esta solución fué mezclada perfectamente y diluída de nuevo 1:5 en amortiguador, resultando así ideal para ser añadida a las cajas de Petri tratadas ya con tolueno con las cepas fúngicas A. niger h-178 y A. nidulans (Pabā).

Las cajas de Petri, con la solución del cromógeno y la glucosa (sustrato para la enzima) se incubaron a 37°C durante 15 min.

Finalmente se eliminó el líquido de la caja, procediendo a su observación sobre una lámpara de luz blanca, evidenciando la reacción química verificada al combinarse el 2-6 diCl θ -indo θ (8,15,21) la glucosa y la glucosa oxidasa presente en las células fúngicas.

La reacción de los sustratos y la enzima (glucosa, 2-6 diCl θ indo θ y la glucosa oxidasa, respectivamente) se logra cuando se afectan las paredes fúngicas con el tratamiento de tolueno, permitiendo la incorporación de la solución al citoplasma y provocando una reducción del cromógeno.

6.7 DESARROLLO MICELIAL, EXTRACCION Y DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA OXIDASA EMPLEANDO MEDIO MINIMO CON AMIDEX "30" AL 15%.

La preparación del Med. min. con 15% de Amidex "30" se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección 6.5 y 6.6 (substituyendo la glucosa grado reactivo por el compuesto comercial Amidex "30" al 15%).

La inoculación y crecimiento de las cepas A. niger h-178 y A. nidulans (Pabā) se efectuó de la forma indicada en la sección 6.4.

Para la obtención de los extractos, el micelio fué macedado con nitrógeno líquido y vidrio molido (4,17,21), resuspendido y mezclado muy bien en amortiguador fosfato-citrato $2.5 \times 10^{-4}M$ (ver Secc. 6.5).

La modificación incluída consistió solamente en un paso de centrifugación, para eliminar del micelio dañado, conservando solamente el sobrenadante (líquido enzimático). La modificación en el uso del equipo Millipore para filtración, fué descartado, al resultar mucho más costoso su empleo. La centrifugación por su parte, se realizó durante 10 min. a 5000 rpm y a una temperatura mínima de 4°C y máxima de 10°C, en la Centrífuga Sorvall RC5C. Concluída esta operación, el sobrenadante fué colectado con una jeringa, para evitar la inclusión de grandes partículas. El extracto así obtenido fué conservado en hielo hasta practicado el ensayo de actividad enzimática.

6.8 ENSAYO CUANTITATIVO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GLUCOSA OXIDASA in vitro.

La determinación cualitativa de actividad enzimática de la glucosa oxidasa expuesta en la sección 6.5, no resultó ser un parámetro bastante confiable, ya que depende de la percepción del investigador. Para evitar tal error la detección de la reacción catalizada por la glucosa oxidasa en presencia de 2-6 diCl θ indo θ fué rastreada en el Espectrofotómetro (6). El-

utilizado en este caso fué el Perkin-Elmer 559 A UV/VIS Spectrophotometer, con graficador acoplado.

El procedimiento realizado fué el siguiente (36):

Se preparó el 2-6 diclorofenol-indofenol (8,15,21) al 0.005 M en amortiguador fosfato-citrato 2.5×10^{-4} M, pH 5.6, haciendo posteriormente una dilución 1:10, a la que se le añadió 0.277 M de glucosa (18,21), agitando y diluyendo nuevamente en amortiguador (dilución 1:6 o) hasta que se obtuvo una absorbancia de 1.3 a 1.5 aproximadamente, en el espectrofotómetro (6) a una longitud de onda de 600 nm.

En todos los experimentos cualitativos y cuantitativos in vitro de actividad de la glucosa oxidasa, se empleó como control positivo de actividad enzimática una solución de glucosa oxidasa "Sigma", con 3 a 5 mg/ml en amortiguador fosfato-citrato 2.5×10^{-4} M, pH 5.6.

Para el ensayo espectrofotométrico (6), se calibró primero el aparato a cero con solución de amortiguador fosfato-citrato 2.5×10^{-4} M, pH 5.6, en dos celdas espectrofotométricas desechables a una longitud de onda de 600 nm. Colocando luego 2 ml. de la solución del cromógeno (2-6 diCl \emptyset indo \emptyset) con el sustrato en una celda, con una micropipeta Gilson pipetman; se tomó lectura de absorbancia inicial, hasta lograda una de 1.4 aproximadamente. Incorporando posteriormente a la misma celda la cantidad de muestra deseada (de 10 a 200 μ l).

Como control positivo se utilizó invariablemente la solución de glucosa oxidasa "Sigma", agregando cantidades variables de la misma (50-100 μ l o más). Hecho lo anterior, se agitó rápidamente el contenido de la celda, checando la absorbancia y marcando el rango en el graficador, que generalmente fué establecido en 0.5, con una velocidad de 2 cm/min durante 5 minutos.

De esta manera fué posible observar el decremento de absorbancia por minuto (∇ ABS min^{-1}), dato indispensable para el cálculo de la actividad específica de la enzima (38).

Otro parámetro importante para esta determinación fué la concentración de proteínas en la muestra analizada. Dicha cantidad fué obtenida por el método de Bradford (39), que se resume a continuación:

1° Se elaboró una curva de concentración de proteínas combinando 2 ml de reactivo de Bradford (39), en tubos de ensayo con 10, 20 y 30 μ l de solución de albúmina de suero bovino (B.S.A.) 1 mg/ml; se agitan los 3 tubos y se dejan reposar durante 15 a 30 minutos aproximadamente (por duplicado).

2° Se agregaron 2 ml. de reactivo de Bradford (39) a cuantos tubos de ensayo se requieran de acuerdo al número de muestras, y se añadió poco a poco los microlitros deseados (con una micropipeta Gilson pipet

man), tratando de imitar el color de los tubos de la curva, preparados en el paso anterior.

3° Se leyó en el espectrofotómetro (6) ULTROSPEC II LKB BIOCROM, SPECTROPHOTOMETER UV/VISIBLE 4050 a 695 nm (39) en celdas de cuarzo, el contenido de cada uno de los tubos de ensayo.

4° Se determinó en base a la curva de concentración, en papel milimétrico o por cálculo de regresión lineal la cantidad de proteínas en miligramos por mililitro de cada uno de los extractos.

Finalmente, el cálculo de la actividad específica (Q) de la glucosa oxidasa de cada muestra, se obtuvo considerando el decremento de absorvancia por minuto por miligramo de proteína ($\nabla\text{ABS min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (11,38).

La fórmula para calcular la actividad específica de la glucosa oxidasa, se despejó a partir del planteamiento $A=EbC$ (38), donde A es igual al decremento de absorvancia por minuto, E es el coeficiente de extinción Molar del 2-6 diCl β indo β (40), b se refiere al ancho de la celda y C es igual a la concentración de proteínas en miligramos.

De esta manera, substituyendo los parámetros con los datos obtenidos, resultó simple la determinación de Q de las diferentes muestras.

6.9 COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS CEPAS

A. niger h-178, A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā).

Las cepas fúngicas empleadas en el presente trabajo fueron: A. niger h-178, A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā) (ver la sección 6.1 de Materiales y Métodos). Las dos primeras se reportan como productoras de enzimas sacarofílicas y glucosa oxidasa, respectivamente (35); sin embargo, la cepa sometida inicialmente al ensayo cuantitativo de actividad específica de la glucosa oxidasa fué A. niger h-178 por la facilidad de haberla tenido a disposición en el laboratorio. La segunda utilizada fué A. niger h-175, comprobando satisfactoriamente su actividad enzimática, siendo tratada en condiciones idénticas a A. niger h-178 y A. nidulans (Pabā). A. nidulans (Pabā) por su parte, siempre representó el patrón o control negativo de actividad enzimática.

La metodología seguida para la comparación de la actividad específica de la glucosa oxidasa de las cepas A. niger h-178, A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā), fué igual a la explicada a detalle anteriormente en las secciones 6.6, y 6.7 de Materiales y Métodos, empleando para el cultivo del hongo el Medio mínimo para Aspergillus spp. con 15% de Amidex "30".

La inoculación se hizo en igual forma a la indicada en la sección 6.4, incubando tanto a 24 como a 48 horas, para constatar a qué tiempo era mayor la síntesis enzimática; en

razón de que Barker y Shirley (15) reportan tiempos cortos de incubación.

En todos y cada uno de los ensayos se empleó como control positivo de actividad enzimática la mostrada por la glucosa oxidasa "Sigma" y como control negativo los extractos de A. nidulans (Pabā).

6.10 ENSAYO GLOBAL DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GLUCOSA OXIDASA in vitro EMPLEANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

6.10.1 Medios de cultivo. Para el ensayo global de actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa se probaron cada uno de los medios de cultivo que aparecen en la Tabla 4.

La forma de preparar los medios fué tal y como se señala en la sección 6.4 para la elaboración del Med. min., considerando las especificaciones indicadas en la Tabla 4 con 1 y 10% de glucosa anhidra.

En el caso de la preparación del Medio rico para Aspergillus spp. la adición a la fórmula del Med. min. de 6 g/l de extracto de levadura y 20 ml/l de solución de aminoácidos (fenilalanina, prolina y metionina al 1% en agua destilada y filtrada con equipo Millipore) fué indispensable

TABLA 4. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA LA PRODUCCION DE LA GLUCOSA-OXIDASA.

No.	Medio de Cultivo.	Fuente de carbono (%)	
		Glucosa	Amidex "30"
1	Med.min.básico	1	- - -
2	" " "	10	- - -
3	Med.rico básico	1	- - -
4	" " "	10	- - -
5	Med.min. básico	- - -	15
6	" " "	- - -	33
7	Med. Zetelaki	- - -	- - -

Medios de cultivo ensayados para la inducción de la síntesis de glucosa oxidasa, por parte de A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā), desarrollados a un pH de 6.5, a 37°C y 300 rpm durante 24 y 48 h. Las abreviaturas representan: No.: número del medio; Med. min. básico: Medio mínimo básico para Aspergillus spp.; Med. rico básico: Medio rico para Aspergillus spp, Med. Zetelaki: Medio reportado por Zetelaki (15). Las columnas de fuente de carbono indican las concentraciones de Glucosa anhidra y Amidex "30" presente en los medios de cultivo en porcentaje. La línea punteada evidencia ausencia de la sustancia.

ble (ver secciones 6.2.5 y 6.4).

El Med. min. con diferentes concentraciones de Amidex "30", implicó solo el gran cuidado en la disolución del compuesto comercial; en tanto que el Zetelaki (15) precisó tan solo de la mezcla de cada uno de los reactivos que lo constituyen (revisar sección 6.2.6).

Para todos los medios de cultivo antes señalados, el pH fué ajustado a 6.5, se esterilizaron normalmente (15 min. a 15 lb. de presión); luego de salir de la autoclave se dejaron enfriar para añadir la solución de Paba a los medios mínimos que llevaron A. nidulans (Pabā), así como la solución de aminoácidos a los medios ricos. Se colocaron 300 ml de medio en matraces Erlenmeyer de un litro de capacidad. Su inoculación se realizó de la misma manera explicada en la Sección 6.4

La incubación fué a 37°C y 300 rpm durante 24 y 48 horas, empleando las cepas A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā).

- 6.10.2 Determinación del Peso Seco. La colecta micelial fué realizada en la forma habitual (ver sección 6.4), sólo que esta vez se tomaron por sepa

rado muestras de 20 ml (por duplicado) del medio con micelio, una vez retirado de la incubación. El micelio se obtuvo filtrándolo con tela de seda; y una vez lavado con agua destilada, se procedió a secarlo, presionándolo en papel absorbente.

Las pastillas (micelio compactado) colectadas fueron pesadas en una pequeña charola de aluminio, exponiéndolas a una temperatura de 60°C en una incubadora, durante las horas requeridas para detectar, luego de la eliminación de agua de la muestra (por evaporación), su peso contante. Este dato nos permitió obtener el peso seco del micelio cosechado, por volumen de medio de cultivo.

- 6.10.3 Determinación de Azúcares reductores en los diferentes medios de cultivo, y en sus filtrados posteriores al desarrollo fúngico. Considerando que el A. niger h-175, requiere para su crecimiento e inducción de la síntesis enzimática (12, 15, 18, 20) cantidades relevantes de glucosa, fué practicando el análisis de los azúcares reductores presentes en los diferentes medios de cultivo preparados, para detectar variaciones en el consumo o producción de azúcares.

Para la determinación de azúcares reductores, se tomaron muestras iniciales del medio de cultivo sin inóculo, tanto como alícuotas (muestras) del filtrado obtenido en los matraces de 24 y 48 horas de incubación.

La determinación de azúcares reductores se efectuó con el ensayo que emplea Acido Dinitrosalicílico (Método DNS) (41), cuyo proceso se especifica a continuación:

1. Preparación del reactivo DNS, de acuerdo a la referencia 41, constituido a base de Hidróxido de sodio, Acido Dinitrosalicílico, Tartrato de sodio y potasio, Fenol y Metabisulfito de sodio.
2. Preparación de una solución de glucosa 1 mg/ml.
3. Curva de concentración para la determinación de la cantidad de azúcares reductores. Para ello, se colocaron once tubos de ensayo (por duplicado), marcados del cero al diez en una gradilla, con volúmenes crecientes de la solución de glucosa, incrementando el volumen de 100 en 100 μ l; a excepción del tubo de ensayo cero, que no debe contener glucosa.

Todos los tubos se aforaron a 1.5 ml con agua destilada, añadiéndoles luego 3 ml. del reactivo DNS (41) a cada uno, mezclando perfectamente en agitador Vortex. Los tubos después fueron sometidos a baño maría a

100°C, durante 5 min., posteriormente fueron aforados a 20 ml. con agua destilada. Una vez agitados en Vortex, el contenido de los tubos fué vertido a celdas espectrofotométricas.

4. Calibración del Espectrofotómetro. El espectrofotómetro marca ULTROSPEC II LKB BIOCROM, ESPECTROPHOTOMETER UV/VISIBLE 4050 se calibró con el contenido del tubo cero, que no contenía glucosa, a una longitud de onda de 550 nm (41).
5. Gráfica de concentración. La gráfica de concentración se realizó en papel milimétrico, indicando densidad óptica contra concentración de azúcar para cada una de las muestras (o en calculadora por regresión lineal).

Para la determinación de Azúcares Reductores (41) en las diferentes muestras obtenidas del medio de cultivo, éstas se trataron en forma similar a la indicada en el paso 3. Así, primero se marcaron los tubos, incorporando X cantidad de muestra* (10,100 o más microlitros), aforando con agua destilada a 1.5 ml, finalmente se les agregó 3 ml de reactivo DNS (41) a cada tubo, agitando muy bien en el "Vortex".

Posteriormente todos los tubos fueron colocados a baño

*Para facilitar y determinar con precisión las lecturas, en algunas ocasiones se diluyeron las muestras.

maría a 100°C durante 5 minutos, llevando el volumen a 20 ml. con agua destilada, agitando vigorosamente.

Consecutivamente se procedió a la lectura espectrofotométrica de las distintas muestras, en igual forma a la señalada en los pasos 4 y 5, anteriormente expuestos.

El cálculo de la cantidad de azúcares reductores en miligramos por mililitros de muestra, para cada una de las ensayadas, se basó únicamente en la curva de concentración realizada en el paso 3 (41).

6.10.4 Determinación cuantitativa in vitro de la actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa. La determinación cuantitativa in vitro implicó por supuesto, todo lo expuesto con anterioridad, en las secciones relacionadas con el punto 6.8.

El método de cultivo y extracción de la muestra enzimática en cada uno de los micelios colectados (de los diferentes medios de cultivo empleados, ver Secc. 6.10.1), se practicó normalmente (consultar las Secc. 6.10.1, 6.4, 6.5 y 6.6), las alícuotas (muestras) finales fueron objeto del ensayo de actividad específica de la glucosa oxidasa con el 2-6 diCl θ indo θ (8,15,21) con el método cinético en el espectrofotómetro (6) (ver sección 6.8).

Resulta imprescindible recordar también que el cálculo de

la cantidad de proteínas en mg/ml de la muestra (por el método de Bradford (39), ver la sección 6.8) fué fundamental para la determinación de la actividad específica enzimática de la glucosa oxidasa (11,38) de cada uno de los extractos fúngicos.

6.11 METODOS ESTADISTICOS PARA EL ANALISIS DE LOS RESULTADOS.

Los métodos estadísticos empleados fueron:

1. El Análisis de Varianza Múltiple (ANOVA) para cubrir en un espacio máximo las pruebas de las mediciones de los fenómenos estudiados, de acuerdo al diseño experimental de dos criterios de clasificación.

Este modelo analiza la variación total de una respuesta descomponiéndola en porciones independientes y significativas; teniendo como objetivo la identificación de variables independientes importantes en un experimento, y determinar cómo actúan entre sí y afectan a la respuesta.

2. El t de student, modelo probabilístico empleado comúnmente en el trabajo inferencial, al comparar la significancia probabilística de dos medias aritméticas. Si la probabilidad (p) obtenida por este método (también para ANOVA) es menor de 0.5 se evidencia la diferencia significativa entre ambos datos; en tanto que si el valor de p es mayor de 0.5, se denota que no hay diferencia significativa entre las medias.

Ambos estudios estadísticos se efectuaron en el área de informática de la Facultad de Ciencias.

7. RESULTADOS

7.1 COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA ESPECIFICA DE LA GLUCOSA OXIDASA DE LOS EXTRACTOS DE A. niger h-178, A. niger h-175, A. nidulans (Pabā) Y LA GLUCOSA OXIDASA COMERCIAL "SIGMA".

La determinación de la actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa descrita en Materiales y Métodos, precisó de una serie de ensayos previos, que incluyeron a grandes rasgos:

7.1.1 Determinación cualitativa in vitro de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa. El desarrollo del ensayo para determinación cualitativa in vitro de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa, permitió la obtención de los extractos enzimáticos provenientes del micelio cultivado en el Medio mínimo básico para Aspergillus spp., cuya variable específica fué la concentración de glucosa.

Al propio Medio mínimo (Dr. A. Paszeuski, comunicación personal) se le modificó en nuestro laboratorio, la concentración de glucosa en un rango de 1, 5, 10, 20 y 40% (glucosa anhidra grado reactivo).

Los resultados de la determinación cualitativa in vitro mostraron que los extractos de los mices

lios de A. niger h-178 en los medios de cultivo con una concentración de glucosa (grado reactivo) de 5% en adelante, presentaron actividad de la glucosa oxidasa, reduciendo el 2-6 diCl \emptyset indo \emptyset , que viró en coloración de azul intenso a morado-lila-rosa-transparente.

La muestra que se utilizó como control positivo de actividad enzimática, es decir, la solución de glucosa oxidasa comercial "Sigma", también transformó el cromógeno (2-6 diCl \emptyset indo \emptyset) haciéndolo cambiar de azul intenso a gris y transparente.

Por su parte los extractos de A. nidulans (Pabā) desarrollados en las mismas condiciones, y ensayados de igual forma, no transformaron el cromógeno debido a la ausencia de glucosa oxidasa en las muestras.

En virtud de que quedó demostrada la importancia de la presencia de glucosa (grado reactivo) en altas concentraciones (5% o más) en el medio de cultivo, para inducir la síntesis de glucosa oxidasa; este requerimiento fué substituído experimentalmente por el compuesto comercial Amidex "30" al 15% igualando la concentración de equivalentes de dextrosa libre indispensables.

7.1.2 Determinación cualitativa in vivo de la glucosa oxidasa. Habiendo determinado cualitativamente por el método in vitro (ruptura drástica del micelio para la liberación de la enzima) la actividad enzimática de la glucosa oxidasa, se consideró importante la comprobación de la efectividad del ensayo de detección enzimática (con el 2-6 diCl₀indo \emptyset)

Para ésto se realizó la determinación cualitativa in vivo de la actividad de la glucosa oxidasa, probando las cepas fúngicas A. niger h-178 (primera cepa a disposición) y A. nidulans (Pabā), cultivadas en Med. min., pero substituyendo la glucosa requerida por 15% de Amidex "30" y agar-agar en cajas de Petri.

La observación de las cajas de Petri (una vez practicado el ensayo) en donde fueron cultivadas las cepas A. niger h-178 y A. nidulans (Pabā), examinadas en la lámpara de luz blanca revelaron invariablemente la presencia de un halo rosado alrededor del micelio desarrollado en Aspergillus niger h-178; que no fué evidenciado en las zonas aledañas al micelio de A. nidulans (Pabā).

La determinación cuantitativa in vitro de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa detectada en los diferentes extractos enzimáticos (de las cepas A. niger h-178, A. niger

h-175, y A. nidulans (Pabā), cultivadas en Med. min. con 15% de Amidex "30" a pH 6.5, durante 24 y 48 hrs. a 37°C), por el método espectrofotométrico del 2-6 diCl θ indo θ ; arrojó los datos de decremento de absorbancia por minuto, que junto con las cifras de la cantidad de proteínas en miligramos (por Bradford) de las muestras ensayadas, nos permitieron la obtención de la actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa, en micromoles de sustrato transformados por minuto, por miligramo de proteína: $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, parámetro confiable para la comparación de la efectividad de la síntesis de la glucosa oxidasa por las cepas fúngicas.

Los resultados de la actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa se muestran en la Tabla 5.

Al aplicar el método estadístico de Análisis de Varianza múltiple a los datos de la tabla 5, comparando los valores de cada ensayo de una muestra, el cálculo reveló una $p=0.35910$, indicadora de la semejanza entre los tres ensayos (Tabla 5). Sin embargo, la comparación entre las muestras reveló una $p < 10^{-6}$, denotando que sí hay una diferencia significativa entre ellas, correspondientes a las distintas muestras ensayadas: glucosa oxidasa "Sigma", A. niger h-178, A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā), considerando para las tres últimas, alícuotas de 24 y 48 horas de incubación en el Med. min. con 15% Amidex "30".

Al desarrollar el modelo t de student, comparativo pa-

ra cada posible combinación de muestras, se obtuvieron valores de p que corroboraron diferencias significativas entre cada una de las muestras.

En relación a la Tabla 5, las distinciones consideradas en función del porcentaje alcanzado, se muestran en la Tabla 6; tomando en cuenta invariablemente el valor de Q obtenido por la glucosa oxidasa "Sigma", como el 100% de la actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa (por ser una enzima químicamente pura).

TABLA 5. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA GLUCOSA OXIDASA (Q) DE LOS EXTRACTOS FUNGICOS ENSAYADOS.

Designación de la muestra.	Tiempo de cultivo h.	Q ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)			
		1°	2°	3°	\bar{X}
E \leq	---	0.05	0.08	0.07	0.066 \pm 0.015
<u>A. niger</u> h-178	24	0.08	0.09	0.12	0.096 \pm 0.02
" " h-175	24	3.75	3.85	4.03	3.87 \pm 0.14
" " h-178	48	0.04	0.06	0.07	0.06 \pm 0.012
" " h-175	48	0.14	0.08	0.09	0.1 \pm 0.032
<u>A. nidulans</u> (Pabã)	24	0.001	0.001	0.002	0.0015 \pm 0.0005
" "	48	0.001	0.0009	0.001	0.0009 \pm 0.000005

p = 0.3591

P < 10⁻⁶

Tabla que incluye los datos de la actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa en μmol de sustrato transformados/min/mg de proteína, obtenida por el método espectrofotométrico a 600 nm. de longitud de onda, a temperatura ambiente,

Continuación de la Tabla No. 5.

con el 2-6 diCl θ indo θ , realizado por triplicado. Los extractos ensayados fueron A. niger h-178, A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā), cultivadas tanto durante 24 como 48 horas a 37°C y 300 rpm en Med. min. con 15% de Amidex "30" a pH 6.5. El testigo positivo fué la solución de glucosa oxidasa "Sigma" (E Σ) y el negativo, los extractos de A. nidulans (Pabā); se representa además la Q (promedio) mostrada, la desviación standar , tanto como la p registrada por el ANOVA.

TABLA 6. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA GLUCOSA OXIDASA OBTENIDA POR LAS MUESTRAS: A. niger h-175, A. niger h-178, A. nidulans (Pabā) Y LA GLUCOSA OXIDASA "SIGMA".

MUESTRA	INCUBACION h	PORCENTAJE (%)
<u>A. niger</u> h-175	24	439.39
<u>A. niger</u> h-175	48	151.51
<u>A. niger</u> h-178	24	145.45
Sol. GO "Sigma"	---	100
<u>A. niger</u> h-178	48	90.9
<u>A. nidulans</u> (Pabā)	24	2.27
<u>A. nidulans</u> (Pabā)	48	1.39

Se comparan los valores de Q (en porcentaje) mostrados por las diferentes alícuotas sometidas al ensayo enzimático para la obtención de Q, tomando como el 100% de la actividad específica, la Q de la glucosa oxidasa "Sigma".

7.2 RENDIMIENTO MICELIAL OBTENIDO DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS (PESO SECO), PARA LA PRODUCCION DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA.

Las distintas muestras miceliales cosechadas de los diversos medios de cultivo ensayados, aparecen representados en la Tabla 7, en función del peso seco obtenido por cada 150 ml. de medio de cultivo.

Se comparan únicamente los micelios de las cepas A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā) (control negativo), descartando a A. niger h-178, en virtud de que aún habiendo mostrado un valor de Q considerable (en relación a la Q de la glucosa oxidasa "Sigma", fué claramente superado por los extractos de A. niger h-175.

Para la interpretación del ANOVA realizado, se establecieron las siguientes Hipótesis nulas (Ho):

- 1) Ho: No hay diferencia significativa entre los siete medios de cultivo.
- 2) Ho: No hay diferencia significativa entre las diferentes muestras por tiempo.
- 3) Ho: No hay interacción entre los medios cultivo y las muestras por tiempo.

En virtud de que la probabilidad asociada en cada uno de los casos es menor de 0.001 (ver Tabla 7), se descartan

TABLA 7. CANTIDAD DE MICELIO OBTENIDO EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS.

MEDIO DE CULTIVO	P E S O S E C O		M I C E L I A L (g)			
	<u>A. niger</u> h-175		<u>A. nidulans</u> (Pabā)			
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Med. min.	0.075 ± 0.003	0.26 ± 0.03	0.09 ± 0.009	0.3 ± 0.02		
" " con 10% Glu	0.9 ± 0.107	1.53 ± 0.06	0.8 ± 0.15	1.3 ± 0.11		
Med. rico	1.05 ± 0.23	2 ± 0.1	0.78 ± 0.008	0.9 ± 0.006		
Med. rico con 10% Glu	1.08 ± 0.16	2.5 ± 0.05	0.08 ± 0.003	1.23 ± 0.02		
Med.min.con 15% Amx	0.7 ± 0.22	1.27 ± 0.025	0.4 ± 0.07	0.7 ± 0.12		
" " " 33% Amx	0.8 ± 0.08	2.05 ± 0.06	0.5 ± 0.03	1.02 ± 0.03		
Zetelaki	1.27 ± 0.09	2.9 ± 0.07	0.9 ± 0.08	2.01 ± 0.06		

p = 0.000001

Tabla en la que se muestra el peso seco del micelio de A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā), producido en cada uno de los siete medios de cultivo ensayados. El rendimiento micelial (peso seco), es expresado en gramos de micelio obtenidos por cada 150 ml. de medio de cultivo. Las abreviaturas de los medios corresponden al: Medio mínimo básico para Aspergillus spp: (Med. min.), Medio mínimo para Aspergillus spp. adicionado con 10% de glucosa: (Med. min. con 10% Glu), Medio rico para Aspergillus spp. (Med. rico); Medio rico para Aspergillus spp con 10% de glucosa: (Med. rico

con 10% Glu); Med. min. con 15% de Amidex "30": (Med. min. con 15% Amx), Med. min. con 33% de Amidex "30": (Med. min. con 33% Amx), y el Medio Zetelaki. Las cepas fúngicas desarrolladas fueron: Aspergillus niger h-175 y A. nidulans (Pabā), incubadas durante 24 y 48 horas a 37°C y 300 rpm para cada una de ellas. Las cifras representan el promedio de tres ensayos efectuados, con sus respectivas desviaciones standar. El ANOVA determinó la p que aquí se señala.

las Hipótesis nulas, aceptándose por tanto las Hipótesis alternativas (H_1) que a continuación se expresan:

- Por el medio de cultivo, existe diferencia altamente significativa, concluyendo que los medios de cultivo producen mediciones diferentes.
- Por peso seco, existen diferencias altamente significativas, por lo cual los valores de peso seco hacen diferencias entre las mediciones.
- La interacción entre medio de cultivo y peso seco, producen diferencias altamente significativas sobre las mediciones, determinando que se trata de un sistema altamente sensible a las variaciones entre factores intervinientes, independientemente de la acción del azar.

7.3 DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA LA PRODUCCION DE LA GLUCOSA OXIDASA.

Para ello se analizó tanto la concentración de azúcares reductores de los siete medios de cultivo ensayados antes de ser inoculados (con las cepas A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā); así como los filtrados obtenidos después de 24 y 48 hrs. de incubación de cada uno de los hongos. Los resultados de este experimento aparecen en la Tabla 8.

Al realizar la determinación estadística del ANOVA en

TABLA 8. CUADRO COMPARATIVO DE LA CONCENTRACION DE AZUCARES REDUCTORES DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EXPERIMENTADOS.

MEDIO DE CULTIVO	MEDIO SIN INOCULO	CONCENTRACION DE GLUCOSA mg/ml			
		F I L T R A D O			
		<u>A. niger</u> 24 hr.	h-175 48 hr.	A. nidulans (Pabā) 24 hr.	48 hr.
Med. min.	11.5 ± 0.650	8.3 ± 0.31	6.4 ± 0.45	7.1 ± 0.25	5.8 ± 0.55
Med. min. con 10% Glu	98.2 ± 1.4	61.4 ± 1.6	59.0 ± 0.32	81.0 ± 1.35	77.0 ± 1.2
Med. rico	8.6 ± 1.37	6.2 ± 0.37	4.7 ± 0.45	6.5 ± 0.52	6.2 ± 0.4
Med. rico con 10% Glu	107.6 ± 5.4	92.0 ± 1.87	54.8 ± 0.87	86.1 ± 1.48	76.1 ± 4.9
Med. min. con 15% Amx	61.5 ± 2.08	68.6* ± 1.09	43.3 ± 3.1	83.4* ± 1.5	87.2* ± 2.6
Med. min. con 33% Amx	191 ± 2.31	180.4 ± 0.9	151.2 ± 2.07	188.2 ± 1.1	166.2 ± 6.1
Zetelaki	1.5 ± 0.15	49.8* ± 1.19	21.4* ± 1.7	44.5* ± 2.4	38.9 ± 1.7

p = 0.000001

La relación de los diferentes medios de cultivo que figuran en el cuadro es la misma que se expresa en la Tabla 7. La concentración de azúcares reductores está representada en miligramos de glucosa por mililitro de muestra (mg/ml). El medio sin inóculo hace referencia al análisis inicial del medio de cultivo, antes de ser inoculado

con el hongo, y que se tomó como control positivo. Los filtrados corresponden al líquido descartado una vez que el micelio fué cosechado de los medios de cultivo correspondientes a ambas cepas (A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā), incubadas a diferentes tiempos (24 y 48 h) y por triplicado. Los asteriscos indican los datos más relevantes en contraposición al patrón de disminución de azúcares reductores mostrados por el resto de los medios de cultivo ensayados; se incluye además la p determinada por el ANOVA.

computadora, de los valores de la concentración de glucosa para las diferentes muestras, las H_0 planteadas inicialmente fueron:

- 1) H_0 : No hay diferencias significativas entre los siete medios de cultivo.
- 2) H_0 : No hay diferencias significativas entre las muestras por tiempo.
- 3) H_0 : No hay interacción entre medios de cultivo y muestras por tiempo.

La descripción de las Hipótesis alternativas, al descartarse las H_0 (Tabla 8) se expresan a continuación:

- Por el medio de cultivo, existe diferencia altamente significativa; en conclusión, se denota que los medios de cultivo producen mediciones diferentes.

- Por la concentración de glucosa, existe diferencia altamente significativa, evidenciándose que las concentraciones de glucosa hacen diferencias entre las mediciones.

- La interacción entre los medios de cultivo y la concentración de glucosa, producen diferencias altamente significativas sobre las mediciones, concluyendo que se trata de un sistema altamente sensible a las variaciones entre factores intervinientes, independientemente de la acción del azar.

La interpretación de la Tabla 8, nos evidencia la utili

zación de la glucosa en el desarrollo fúngico, variando un poco entre los diversos medios de cultivo empleados (datos señalados en la Tabla 9). El control positivo del experimento fué la concentración de glucosa (determinada por el ensayo DNS en mg/ml) inicial en los diferentes medios de cultivo antes de ser inoculados, estableciéndose por tanto en ellos el porcentaje comparativo (100%) del experimento.

7.4 DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA GLUCOSA OXIDASA DE LAS CEPAS A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā) COMPARADAS CONTRA LA GLUCOSA OXIDASA "SIGMA", EMPLEANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION ENZIMATICA.

La determinación de la actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa como parámetro fundamental en la selección del medio de cultivo más apropiado para la síntesis de la enzima que nos ocupa (glucosa oxidasa), fué realmente el punto crucial en nuestro estudio.

Comparativamente se ensayaron siete medios de cultivo diferentes, desde los óptimos para el crecimiento selectivo de Aspergillus (Medio mínimo y Medio rico), el reportado por Zetelaki, y por supuesto el más desarrollado en el presente trabajo, basado en la composición del Med. min., pero substituyendo la fuente de carbono original (1% de glucosa) por el Amidex "30" en concentración de 15 y 33%, además de las variantes en las concentraciones de glucosa de los me-

TABLA 9. VARIACION EN LA CONCENTRACION DE AZUCARES REDUCTORES DETERMINADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LAS CEPAS A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā) EN LOS MEDIOS DE CULTIVO ENSAYADOS.

MEDIO DE CULTIVO	MUESTRA	VARIACION EN LA (GLUCOSA)(%)		
		to	24 h	48 h
Med. min.	<u>A. niger</u> h-175	100	72.17	55.65
	<u>A. nidulans</u> (Pabā)	"	61.73	50.43
Med. min. con 10% Glu	<u>A. niger</u> h-175	"	62.52	60.08
	<u>A. nidulans</u> (Pabā)	"	82.48	78.41
Med. rico	<u>A. niger</u> h-175	"	72.09	54.65
	<u>A. nidulans</u> (Pabā)	"	72.58	72.09
Med. rico con 10% Glu	<u>A. niger</u> h-175	"	85.50	50.92
	<u>A. nidulans</u> (Pabā)	"	80.01	70.72
Med. min. con 15% Amx	<u>A. niger</u> h-175	"	111.54	70.4
	<u>A. nidulans</u> (Pabā)	"	135.6	141.78
Med. min. con 33% Amx	<u>A. niger</u> h-175	"	94.45	79.16
	<u>A. nidulans</u> (Pabā)	"	98.53	87.01
Zetelaki	<u>A. niger</u> h-175	"	3 320.00	1 426.6
	<u>A. nidulans</u> (Pabā)	"	2 966.00	2 593.3

Cuadro que señala las fluctuaciones (en porcentaje) de la concentración de azúcares reductores (Glucosa) determinados

por el ensayo DNS a las muestras de los medios de cultivo iniciales (to), tanto como a los filtrados, luego del crecimiento fúngico de las cepas A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā), durante 24 y 48 horas de incubación a 37°C y 300 rpm.

dios, experimentadas en virtud de la relevancia de la glucosa como inductora del crecimiento y síntesis de la enzima glucosa oxidasa.

Al igual que en los experimentos anteriores, las cepas fúngicas utilizadas para la producción de la glucosa oxidasa fueron A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā), esta última empleada únicamente como control negativo de actividad enzimática. Ambas fueron cultivadas a 37°C y 300 rpm durante 24 y 48 horas.

Los extractos obtenidos y ensayados posteriormente por el método espectrofotométrico con el 2-6 diCl ϕ indo ϕ , dieron los valores promedio de actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa (en micromoles de sustrato transformados por minuto por miligramo de proteína) que se exponen en la Tabla 10.

Del ANOVA practicado a los datos, las Hipótesis nulas formuladas inicialmente fueron:

- 1) Ho: No hay diferencias significativas entre los siete diferentes medios de cultivo.
- 2) Ho: No hay diferencias significativas entre las muestras por tiempo.
- 3) Ho: No hay interrelación entre los medios de cultivo y las muestras por tiempo.

TABLA 10. CUADRO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA ESPECIFICA DE LA GLUCOSA OXIDASA DE A. niger h-175 y A. nidulans (Pabā) DESARROLLADOS EN DIFERENTES MEDIOS.

MUESTRA ENSAYADA	MEDIO DE CULTIVO	INCB. h	Q $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (PROMEDIO) S	INCB. h	Q $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (PROMEDIO) S
E Σ	-----	---	$7 \times 10^{-2} \pm 0.01$	---	-----
<u>A. niger</u> h-175	Med. min.	24	$1.2 \times 10^{-2} \pm 0.002$	48	$2.5 \times 10^{-2} \pm 0.002$
<u>A. nidulans</u> (Pabā)	"	"	$1 \times 10^{-3} \pm 0.0003$	"	$2 \times 10^{-3} \pm 0.001$
<u>A. niger</u> h-175	Med.min. con 10% Glu	"	$2.6 \times 10^{-2} \pm 0.003$	"	$0.7 \times 10^{-2} \pm 0.01$
<u>A. nidulans</u> (Pabā)	"	"	$7 \times 10^{-4} \pm 0.0001$	"	$2.5 \times 10^{-3} \pm 0.0009$
<u>A. niger</u> h-175	Med. rico	"	$1.3 \times 10^{-2} \pm 0.0002$	"	$0.6 \times 10^{-2} \pm 0.002$
<u>A. nidulans</u> (Pabā)	" "	"	$9 \times 10^{-4} \pm 0.0001$	"	$3 \times 10^{-3} \pm 0.001$
<u>A. niger</u> h-175	Med. rico con 10% Glu	"	$2.35 \times 10^{-2} \pm 0.0003$	"	$4 \times 10^{-2} \pm 0.007$
<u>A. nidulans</u> (Pabā)	"	"	$1 \times 10^{-3} \pm 0.0006$	"	$8 \times 10^{-4} \pm 0.0001$
<u>A. niger</u> h-175	Med. min. con 15% Amx	"	3.85 ± 0.4	"	$9.3 \times 10^{-2} \pm 0.007$

Continuación de la Tabla No. 10.

MUESTRA ENSAYADA	MEDIO DE CULTIVO	INCB. h	Q $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (PROMEDIO) S	INCB. h	Q $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (PROMEDIO) S
<u>A. nidulans</u> (Pabā)	Med. min. con 15% Amx	24	$1.5 \times 10^{-3} \pm 0.0005$	48	$3 \times 10^{-3} \pm 0.001$
<u>A. niger</u> h-175	Med. min. con 33% Amx	"	1.37 ± 0.08	"	$7.09 \times 10^{-1} \pm 0.009$
<u>A. nidulans</u> (Pabā)	"	"	$3 \times 10^{-3} \pm 0.001$	"	$2 \times 10^{-3} \pm 0.001$
<u>A. niger</u> h-175	Zetelaki	"	$6 \times 10^{-2} \pm 0.015$	"	$2.6 \times 10^{-2} \pm 0.002$
<u>A. nidulans</u> (Pabā)	"	"	$5 \times 10^{-3} \pm 0.001$	"	$3 \times 10^{-3} \pm 0.001$

Valores de la Q de los extractos de A. niger h-175, y A. nidulans (Pabā), cultivados en siete diferentes medios de cultivo (las especificaciones incluidas son las mismas que se expresan en la Tabla 7), todos ajustados a un pH de 6.5, y conservados en incubación a 37°C y 300 rpm. El método empleado para la determinación de Q fué el espectrofotométrico con el 2-6 dicloroindo. Las abreviaturas que se incluyen corresponden: E Σ indica la solución de glucosa oxidasa "Sigma" (control positivo); A. niger

Continuación de la Tabla No. 10.

h-175 y A. nidulans (Pabā) son los extractos ensayados 24 y 48 h, Q promedio denota los valores mostrados en μmol de sustrato transformados/min/mg de proteína; mientras que la S es la desviación standar de los tres ensayos efectuados.

En base a los valores registrados en el ANOVA ($p=0.000001$) se rechazan las H_0 ya que la $p < 0.001$, aceptándose las siguientes hipótesis alternativas:

- Por el medio de cultivo, existe diferencia altamente significativa, demostrando que los medios de cultivo producen mediciones diferentes.
- Por los valores de actividad enzimática reportados, existe diferencia altamente significativa, por lo que se determina que la actividad enzimática es diferente entre las mediciones.
- La interacción entre los medios de cultivo y la actividad enzimática, producen diferencias altamente significativas sobre las mediciones, concluyendo que se trata de un sistema altamente sensible a las variaciones entre factores intervinientes, independientemente de la acción del azar.

Como para los otros resultados expuestos, la interpretación más accesible de los datos comparativos de la actividad específica de la glucosa oxidasa (en porcentaje) se muestran en la Tabla 11, en la cual la Q obtenida con la enzima "Sigma" se considera como 100%.

TABLA 11. VALORES EN PORCENTAJE DE LA Q (PROMEDIO) REGISTRADA POR LAS ALICUOTAS SOMETIDAS AL ENSAYO CUANTITATIVO in vitro.

MEDIO DE CULTIVO	MUESTRA	INCUBACION h	PORCENTAJE (%)
Med.min.con 15% Amx	A. niger h-175	24	5 500.00
Med.min.con 33% Amx	A. niger h-175	24	1 957.14
" "	" " "	48	1 012.8
Med.min.con 15% Amx	" " "	48	132.85
----	G O "Sigma"	---	100
Zetelaki	A. niger h-175	24	85.71
"	" " "	48	37.14
Med.rico con 10% Glu	" " "	24	35.57
"	" " "	48	57.14
Med.rico	" " "	24	18.57
" "	" " "	48	85.71
Med.min.con 10% Glu	" " "	24	37.14
"	" " "	48	100.0
Med.min.	" " "	24	17.14
"	" " "	48	35.71
Zetelaki	A. nidulans (Pabā)	24	7.14
"	" " "	48	4.28
Med.min.con 15% Amx	A. nidulans (Pabā)	24	2.14
"	" " "	48	4.28
Med.min.con 33% Amx	A. nidulans (Pabā)	24	4.28
"	" " "	48	2.85
Med.min.	A. nidulans (Pabā)	24	1.42
"	" " "	48	2.85
Med.min.con 10% Amx	" " "	24	1.0

Continuación de la Tabla No. 11.

MEDIO DE CULTIVO	MUESTRA	INCUBACION h	PORCENTAJE (%)
Med.min. con 10% Amx	A. nidulans (Pabā)	48	3.57
Medio rico	" " "	24	1.28
" "	" " "	48	4.28
Med. rico con 10% Glu	" " "	24	1.42
" "	" " "	48	1.14

Cuadro de los valores comparativos de Q de las diferentes muestras ensayadas por el método espectrofotométrico con el 2-6 diClorindo. El 100% de la actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa se fijó en relación a la muestra de la GO "Sigma", basándose por tanto en dicha cantidad para el cálculo porcentual de cada uno de los extractos fúngicos, desarrollados en los diversos medios de cultivo e incubados por espacio de 24 y 48 horas.

8. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La Tecnología de enzimas, como proceso importante de la Biotecnología, incluye toda una serie de procedimientos para la obtención de los compuestos de origen protéico, denominados enzimas (1, 4).

Una enzima que destaca en importancia económica por su gran aplicabilidad en la industria alimenticia y farmacéutica es la glucosa oxidasa (4 - 7, 15, 17, 23).

Después de analizar exhaustivamente la literatura acerca de la glucosa oxidasa, y en virtud de que no se reportan trabajos de aislamiento y purificación de la enzima en nuestro país, se vislumbró la necesidad de encaminar un Proyecto de Investigación aplicada al respecto, empleando recursos y tecnología nacionales, lo que evitaría sin duda (de establecerse la producción) la importación de juegos de reactivos de tal índole, que son adquiridos actualmente a elevados costos.

Por tal motivo se planteó la ejecución del proyecto: "Desarrollo de un medio de cultivo para la producción de la enzima glucosa oxidasa a partir de Aspergillus niger".

La Metodología para la producción industrial de la Glucosa Oxidasa (y de otras enzimas) abarca los siguientes puntos:

- a) Selección de la fuente de extracción.
- b) Medio de cultivo óptimo.

- c) Métodos de cuantificación.
- d) Métodos de extracción.
- e) Aislamiento y purificación.
- f) Escalamiento a nivel planta piloto en fermentadores de diferentes capacidades.
- g) Aplicación idónea de la enzima.

El objetivo del presente trabajo no se extendió a la totalidad de estos puntos, pero la importancia estriba en su contribución al iniciar el desarrollo del proyecto global, con lo que se sentaron las bases para la extracción posterior de la enzima glucosa oxidasa, ya que en virtud de su capacidad catalizadora, al transformar la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (8, 15 y 21), resulta de gran aplicabilidad industrial (4-7, 15, 17 y 22-30).

Este estudio confirmó que el microorganismo de mayor importancia para la producción de la enzima fué A. niger h-175, entre los dos organismos ensayados experimentalmente mediante la determinación de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa; para ello se utilizaron testigos positivos y negativos con objeto de comparar la efectividad del método empleado.

Así mismo, para el análisis comparativo del valor de la actividad enzimática específica (11) fué preciso el seguimiento de diferentes técnicas que incluyeron: el desarrollo de medios de cultivo sólidos (35), líquidos (33), técni

cas de obtención micelial, procesos de extracción enzimática (4, 17, 21) y preponderantemente los ensayos para la determinación cualitativa (in vivo e in vitro) y cuantitativa de actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa (11, 37). Este último fué el punto crucial para la valoración del medio de cultivo más adecuado para la producción de la glucosa oxidasa.

Analizando cada uno de los puntos enunciados en el párrafo anterior, con respecto a los resultados obtenidos, el valor más alto de actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa (en μ moles de sustrato transformados por minuto por miligramo de proteína), determinado por el método espectrofotométrico (6) con el 2-6 diCl θ indo θ (8, 15, 21), se logró con el extracto de A. niger h-175 (35) incubado durante 24 horas en el Med. min. con 15% de Amidex "30", seguido en orden descendente por A. niger h-178 (24 h), A. niger h-175 (48 h), la glucosa oxidasa "Sigma" y la muestra de A. niger h-178 (48 h); siendo menores aún los Q de A. nidulans (Pabā) de 24 y 48 horas de cultivo en el medio líquido (Tabla 5 y 6).

Como se mencionó anteriormente, la equivalencia en concentración de Amidex "30" para el medio de cultivo (15%), se realizó a partir de la efectividad en la producción de glucosa oxidasa por A. niger h-178, en el Med. min. adicionado con 5% de glucosa (grado reactivo).

Por otra parte, logramos determinar su importancia en el medio, actuando como inductor de la síntesis enzimática, tal como ocurre con glucosa (12, 15, 18, 20).

El método espectrofotométrico (6) que utilizó el 2-6 diCl θ indo θ , fué efectivo para la obtención de Q, aunque mostró un patrón de viraje diferente en los extractos de A. niger h-178 y A. niger h-175 con respecto a la glucosa oxidasa "Sigma" (ver resultados en la sección 7.1); debido seguramente (en las muestras de A. niger h-178 y A. niger h-175) a la presencia de gran cantidad de enzimas adicionales, ya que no fueron sometidas a ningún proceso de purificación enzimática.

El extracto con mayor actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa fué A. niger h-175 (35), cultivada a tiempos cortos de incubación (24 h), tal como lo señalan Barker y Shirley en 1980 (15), solo que ahora desarrollado en Med. min. con 15% de Amidex "30". De esta forma se consideró a A. niger h-175 como la mejor cepa para la obtención de glucosa oxidasa.

Las muestras colectadas de A. nidulans (Pabā) tradujeron los resultados esperados, ya que la síntesis de glucosa oxidasa en ella es muy baja (por lo que no hay transformación del 2-6 diCl θ indo θ según lo indicado por Fiedurek en 1986 (12).

Actualmente se emplean diversos procedimientos de ensayos in vivo con fines comparativos, algunos ejemplos son: el método para la detección de la hidrólisis de almidón que emplea reactivo de lugol como indicador de la transformación (42); así mismo, el expresado por Fiedurek en 1986 (12) sobre Caracterización y mutagénesis de hongos para la producción de glucosa oxidasa, muestra también resultados cualitativos categóricos.

En ensayo in vivo realizado en el presente trabajo evidenció claramente la reducción del 2-6 diCl θ indo θ (8, 15, 21) por la enzima glucosa oxidasa al ponerse en contacto sus tratos y enzima, luego de la lesión celular fúngica, que reveló el halo rosado, resultado de la reacción enzimática realizada en A. niger h-178; sin embargo con la cepa A. nidulans (Pabā) no se detectó actividad enzimática de la glucosa oxidasa (8, 12, 15, 21).

Los rendimientos obtenidos en peso seco expresado en gramos de micelio por cada 150 mililitros de medio de cultivo, revelaron que los medios ricos para Aspergillus spp. (con 1 y 10% de glucosa), como aparece en la Tabla 7, permitieron el desarrollo micelial en buen grado, sin ser superados por los Medios mínimos básicos para Aspergillus spp. adicionados con 1 y 10% de glucosa, como los que incluyeron 15 y 33% de Amidex "30"; estos últimos no obstante, resultaron importantes en la inducción de la síntesis de glucosa oxidasa según los valores de actividad enzimática específica mos-

trados.

El medio Zetelaki, al poseer gran cantidad de nutrientes fué favorable evidentemente para el crecimiento micelial (en gramos de peso seco) tal como lo expresa Barker y Shirley en 1980 (15); solo que este medio de cultivo, conforme a los lineamientos del presente trabajo, resultaría, para esca las de producción mayores, bastante costoso.

La Determinación de Azúcares reductores por el Método DNS (en miligramos de glucosa por mililitros de muestra) (39) denotó el aprovechamiento de la glucosa por el hongo pa ra su crecimiento, siendo su principal fuente de carbono; ac tuando además como inductor de la síntesis de glucosa oxidada (12, 15, 18, 20), por lo que se ve disminuída su concentración en los medios incubados 24 y 48 horas, para ambas ce pas fúngicas (Tabla 8 y 9).

Excepciones al patrón antes descrito, lo presentan algunos medios de cultivo (Medio mínimo básico para Aspergillus spp. con 15% de Amidex "30" y el Medio Zetelaki) que inicialmente registraron una concentración de glucosa menor a la mostrada posteriormente, después de 24 y 48 horas de incubación. La explicación probable a lo anterior está relacionado con la capacidad de degradación de los nutrientes del medio que posee el hongo (durante su desarrollo micelial), des doblando las dextrinas u otros carbohidratos menores (fuentes adicionales de glucosa) presentes en el medio de cultivo.

Los resultados finales del trabajo se muestran en las Tablas 10 y 11, con los registros de la actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa de los diferentes extractos fúngicos desarrollados en diversos medios de cultivo. Así, los valores Q promedio de los extractos de A. niger h-175, denotaron una marcada diferencia en la eficacia del Medio mínimo básico para Aspergillus spp. con 15% de Amidex "30" a un pH de 6.5, para la producción de la enzima GLUCOSA OXIDASA, y cuyas condiciones de crecimiento fueron 37°C y 300 rpm incubado por un lapso de 24 h.

En orden descendente del valor de Q, se encontraron los extractos de A. niger h-175, cultivados en Med. min. con 33% de Amidex "30", incubados 48 h.; el Med. min. con 15% de Amidex "30" de 48 h., y el Medio Zetelaki (24 y 48 h. de incubación) (15). Los medios de cultivo restantes (sometidos a la experimentación) revelaron un Q bastante menor.

En base a los resultados anteriormente expuestos, el Medio mínimo básico para Aspergillus spp. con 15% de Amidex "30", desarrollado en el presente proyecto, resultó efectivo para la producción de la glucosa oxidasa, y puede substituir ampliamente al Medio Zetelaki permitiéndonos además una marcada reducción en costos, de ser empleado a una escala mayor en producción industrial.

La ejecución del método analítico enzimático llevado a cabo en este trabajo, demostró la presencia de la enzima glu

cosa oxidasa en los extractos de Aspergillus niger h-175 que incorporados posteriormente a todo un proceso de purificación (de continuarse el procedimiento total de tecnología en zimática), lograría la obtención de una muestra líquida o cristalizada de glucosa oxidasa pura, que podría competir en calidad con cualquiera otra existente en el mercado mundial, abaratando sin duda costos de adquisición nacional.

CONCLUSIONES.

- El microorganismo fúngico que mostró mayor producción de glucosa oxidasa fué A. niger h-175.
- El medio de cultivo que indujo el más alto valor de actividad enzimática específica de la glucosa oxidasa (representada en μmol de sustrato transformados $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) en la cepa A. niger h-175, fué el Medio mínimo básico para Aspergillus spp. con 15% de Amidex "30", a un pH de 6.5 e incubado durante 24 h. a 37°C y 300 rpm.
- El producto comercial Amidex "30" actúa como inductor de la síntesis de glucosa oxidasa en la cepa A. niger h-175.
- El método espectrofotométrico con 2-6 diCl ϕ indo ϕ , fué efectivo para la cuantificación de la actividad enzimática específica (Q) en los extractos enzimáticos.
- El método in vivo para la determinación cualitativa de actividad enzimática de la glucosa oxidasa, resultó adecuado, al emplear el tolueno (para la lesión de la pared celular) y el 2-6 diCl ϕ indo ϕ como indicador de la enzima en cuestión.
- El medio de cultivo del que se obtuvo mayor rendimiento micelial (expresado en gramos de peso seco) fué el Zetelaki (concretamente 1.27 y 2.9 g/150 ml. de medio de A. niger h-175, desarrollado durante 24 y 48 h. respectivamente) en comparación con el resto de los medios ensayados.

- El ensayo DNS para la cuantificación de azúcares reductores (mg/ml) denotó (en la mayoría de los casos) la disminución gradual (evidencia de su utilización por el hongo) de la glucosa en el medio. Excepciones a este patrón lo manifestaron el medio con Amidex "30" y el Zetelaki, debido seguramente al desdoblamiento posterior de las dextrinas y sacarosa presentes en los mismos.

- El ensayo global con los siete medios de cultivo diferentes, corroboró la efectividad del Med. min. con 15% de Amidex "30" (a períodos cortos de crecimiento) para la inducción en la producción de la glucosa oxidasa de A. niger h-175.

9. BIBLIOGRAFIA

1. C.I.A.T.E.J. 1985. Biotecnología. Centro de Investigación en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. México.
2. Bull, A.T.; Holt, G. y Lilly, M.D. 1982. BIOTECHNOLOGIE Tendances et Perspectives Internationales. Organisation de Cooperation et de Developpment Economiques (OCDE). París, France.
3. Office of Technology Assessment, Congress of the United States. Comercial Biotechnology. An International Analysis. 1984. Washington, U.S.A.
4. Wiseman, A. 1975. Handbook of Enzyme Biotechnology. Ellis Horwood Limited Publisher la. Ed. England.
5. Sicard, P. 1982. Applications industrielles des enxymes. En: Les enzymes. Production et utilization industrielles. G. Durand et P. Monzand eds. Gauthier-villars. París, France. p 119-164.
6. Coulet, P.R. y Bertrand, C. 1982. Les principales applications analytiques des enzymes. En: Les enzymes. Production et utilization industrielles. G. Durand et P. Monzand eds. Gauthier-villars. París, France. p. 201-258.
7. Galindo, F.E. 1986. Electroodos biológicos. Ciencia y Desarrollo. 71: 37-54.
8. Keilin, D. y Hartree, E.F. 1948. Properties of Glucose Oxidase (Notatin) J. Biochem. 42: 221-229.
9. Scott, D. 1975. Applications of glucose oxidase. En: Enzymes in food processing. Reed., G. ed. 2a. Ed. Academic press, New York, U.S.A. P 519-547.

10. Shepartz, A.I. y Subers, M.H. 1964. The glucose oxidase of Honey. I. Purification and some general properties of the enzyme. B.B. Acta. 85: 228-237.
11. Lehninger, A.L. 1981. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Ed. Omega, S.A. 2a. Ed. Barcelona, España. p 189-218.
12. Fiedurek, J.; Rogalski, J.; Ilczuck, Z. y Leonowicz, A. 1986. Screening and mutagenesis of moulds for the improvement of glucose oxidase production. Enz. Micro. Technol. 12: 734-736.
13. Tsuge, H.; Natsuaki, O. y Ohashi, K. 1975. Purification, properties, and Molecular Features of Glucosa Oxidase from Aspergillus niger. J. Biochem. 78: 835-843.
14. Pieter, J.; Dijken, J.P. y Veenhuis, M. 1980. Cytochemical Localization of Glucose Oxidase in Peroxisomes of Aspergillus niger. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9: 275-283.
15. Barker, S.a. y Shirley, J.A. 1980. I GLUCOSE OXIDASE. En: Microbial Enzymes and Bioconversions Economic Microbiology. A.H. Rose ed. Academic press. London, England. p 173-181.
16. Linek, V.; Benes, P.; Sinkule, J.; Holecek, O. y Maly, V. 1980. Oxidation of D-Glucose in the Presence of Glucose Oxidase and Catalase. J. Biotechnol. Bioeng. XXII: 2515-2527.

17. Godfrey, T. y Reichelt, J. 1983. GLUCOSE OXIDASE. En: Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry. 1983. The Nature Press, U.S.A. p 428-449.
18. Fogarty, W.M. 1983. Microbial enzymes and Biotechnology. Applied Science Publishers L T D. England. p 111-122.
19. Swoboda, B.E.P. y Massey, V. 1965. Purification and properties of the glucose oxidase from Aspergillus niger. J. Biol. Chem. 240: 2209-2215.
20. Goldsmith, L. Fremont; Murtaugh, J.J., Wenck, P.R. et al. 1960. Method of Preparing Glucose Oxidase. Patente. No Drawing Application 716-896.
21. Kelley, R.L. y Reddy, C.A. 1986. Purification and Characterization of Glucose-Oxidase from Ligninolytic Cultures of Phanerochaete chrysosporium. J. Bact. 1: 269-274.
22. Bauminguer, B.B. 1974. Glucose-Oxidase Determination. J. Clin. Patol. 27: 1015.
23. Chotani, G. y Constantinides, A. 1982. One Line Glucose Analyzer for Fermentation Applications. J. Biotech. and Bioeng. XXIV: 2743-2745.
24. Valentova, O.; Marek, M.; Svec, F.; Stamberg, J. y Vodrazka, Z., 1981. Comparison of Different Methods of Glucose Oxidase Immobilization. J. Biotech. and Bioeng. XXIII: 2093-2104.

25. Cho, Y.K. y Bailey, J.E. 1978. Immobilization of Enzymes on Activated Carbon: Properties of Immobilized Glucoamylase, Glucose Oxidase an Gluconolactonasa. J. Biotech. and Bioeng. XX: 1651-1665.
26. Klei, H.E.; Sunds, D.W. y Gargano, R. 1978. Immobilization of Glucose Oxidase on Macrorreticular Ion Exchange Resins. J. Biotech. Bioeng. XX: 611-617.
27. Ishimori, Y.; Karube, I. y Suzuki, S. 1981. Mechanical Control of the Activity of Glucose Oxidase Immobilized on Porous Polyvinylchloride Membrane. J. Biotech. Bioeng. XXIII: 2601-2608.
28. Ishimori, Y.; Karube, I. y Suzuki, S. 1981. Stress Sensitive Glucose Oxidase-Nylon Membrane. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 13: 19-23.
29. Pifferi, P.G.; Vaccari, A. y Ricci, G., Poli G. y Ruggeri, O. 1982. Stability of Glucose Oxidase and Catalase Adsorved on Variously Activated 13 X Zeolite. Biotech and Bioeng. XXIV: 2155-2165.
30. D'Angiuro, L. 1982. Immobilization of Glucose Oxidase on Sepharose by UV - Initiated Graft Copolymerization. J. Biotech. Bioeng. XXIV: 207-216.
31. Sonawatt, H.M.; Phadke, R.S. y Govil, G. 1984. Covalent Immobilization of FAD and Glucose Oxidase on Carbon electrodes. J. Biotech. and Bioeng. XXVI: 1066-1070.
32. Ville, C.A. 1978. Editorial Interamericana 7a. Ed. México. p 136-169.

33. Onions, A.H.S.; Allsopp, D. y Eggins, H.O.W. 1981. Smith's Introduction to Industrial Mycology. Arnold E. (Publishers). Ltd. 7a. Ed. London, England. 1, p 13, 52, 168, 274, 310 y 350.
34. Fennell, D.I. Aspergillus Taxonomy. 1977. En: Genetics and Physiology of Aspergillus. Smith, J.E. y Pateman, J. A. eds. 1977. Academic Press. U.S.A. p 1-21.
35. Centro de Investigación de Estudios Avanzados I.P.N. Catálogo de Cultivos Microbianos. 1982. Departamento de Bioingeniería y Biotecnología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. México. p 50-51.
36. García-Carreño, F. y Narváez-Nieto, R. Detección enzimática de la glucosa oxidasa empleando el 2-6 diCl₀indo₀ Manual de procedimientos C.I.A.T.E.J.
37. Zabicky, Z.J. y Narváez-Nieto, R. Determinación in vivo de la glucosa oxidasa en cepas fúngicas. Manual de procedimientos. C.I.A.T.E.J.
38. Chang Raymond. Physical-Chemical with Applications Systems Biological. 1977. Academic Press. U.S.A. p 1048.
39. Bradford, M.N.A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. 1976. Analytic al Biochemistry. 72: 248-254.
40. Dawson, R.M.C.; Elliott, D.C.; Elliott, W.H. y Jones, K.M. 2a. Edición 1969. Clarendon Press. Oxford, U.S.A. p 437.

41. Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem 31: 426-428.
42. Bradshaw, B.M., et al. 1976. Microbiología de Laboratorio, Editorial El Manual Moderno. p 98-115.

10. ANEXOS.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente.....
Número 1118/87.....

SRITA. ROSA IRMA NARVAEZ NIETO
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de Tesis "DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTI_
VO PARA LA PRODUCCION DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA A PARTIR
DE ASPERGILLUS NIGER" para obtener la Licenciatura en Biol_
gía.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---
aceptado como Director de dicha tesis el M.en C. Juan Mora-
Galindo.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Septiembre 28 de 1987
El Director



Dr. Carlos Astengo Osuna

FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

[Handwritten signature]

Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. El M.en C. Juan Mora Galindo, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

Al contestar este oficio cifese fecha y número

Guadalajara, Jal., Enero 9 de 1989.

Dr. Carlos Astengo Osuna,
Director de la Facultad de Ciencias,
Universidad de Guadalajara,
P r e s e n t e.

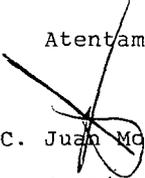
Estimado Doctor:

Por este medio comunico a usted que la Srita. Rosa Irma Narváez Nieto, Pasante de la Licenciatura en Biología, con número de registro 077486917, ha concluido satisfactoriamente el trabajo de Tesis titulado: Desarrollo de un medio de cultivo para la producción de la enzima glucosa oxidasa a partir de Aspergillus niger; realizado en el C. I. A. T. E. J., A. C.

Así mismo le informo que el manuscrito de la Tesis cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo, para ser impreso y proceder al exámen correspondiente.

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,


M. en C. Juan Mora Galindo.

Director de Tesis.