

**CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA (GOX)  
(EC 1.1.3.4.) LIBRE E INMOVILIZADA EN DOS SOPORTES (ALGINATO DE  
SODIO Y AGAROSA) PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO.**

**MILENA SOSA ROMERO  
PATRICIA GALVIS FRANCO**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA “UNAD”  
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS TECNOLOGIA E INGENIERIA  
INGENIERIA DE ALIMENTOS  
BOGOTA 2010**

**CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA (GOX) (EC 1.1.3.4.)  
LIBRE E INMOVILIZADA EN DOS SOPORTES (ALGINATO DE SODIO Y  
AGAROSA) PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO**

**MILENA SOSA ROMERO  
PATRICIA GALVIS FRANCO**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial  
Para optar el título de Ingeniero de alimentos

**Ing. GLAEHTER YOHN FLOREZ GUZMAN  
Director**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA “UNAD”  
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS TECNOLOGIA E INGENIERIA  
INGENIERIA DE ALIMENTOS  
BOGOTA 2010**

Nota de Aceptación

---

---

---

---

---

Firma del presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

## **DEDICATORIA**

A mi mamá que con gran sacrificio y mucho trabajo, ha logrado sacar adelante a sus hijas con todo el amor y buen ejemplo que solo una madre puede dar.

A mi hermana que me tuvo una paciencia enorme y que también en muchas ocasiones aportó su grano de arena para hacer este trabajo una realidad.

**Patricia Galvis F.**

Primero que todo a Dios por permitirme hacer este sueño realidad. A mi esposo Andrés, padres y hermanos por su apoyo incondicional, a mi hijo Tomás quien es el motor de mi vida y a cada una de las personas que de una u otra forma me colaboraron para poder llevar a cabo este trabajo.

| **Milena Sosa R.**

## **TABLA DE CONTENIDO**

**RESUMEN**

**DELIMITACIÓN DEL TEMA**

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

**JUSTIFICACIÓN**

**INTRODUCCIÓN**

**OBJETIVOS**

**OBJETIVO GENERAL**

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **1. MARCO TEORICO**

#### **ENZIMOLOGÍA**

**Nomenclatura y Clasificación de las Enzimas**

#### **1.2 CINETICA ENZIMATICA**

**1.2.1 Enzima Micheliana**

**1.2.2 Enzima Alostérica**

#### **1.3 GLUCOSA OXIDASA**

**1.3.1 Reacción de la Glucosa Oxidasa**

**1.3.2 Activadores de la Glucosa Oxidasa**

#### **1.4 SUSTRATO**

**1.4.1 Glucosa**

#### **1.5 INMOVILIZACION EMZIMATICA**

##### **1.5.1 ALGINATO DE SODIO**

**1.5.1.1 Origen**

**1.5.1.2 Características**

**1.5.2 Estructura Química de los Alginatos**

**1.5.3. Propiedades de la Solución de Alginato de Sodio**

**1.5.4 Efecto del Peso Molecular en el Alginato de Sodio**

**1.5.6 Efecto de la Concentración en el Alginato de Sodio**

- 1.5.7 Efecto de la Temperatura en el Alginato de Sodio**
- 1.5.8 Efecto del pH en el Alginato de Sodio**
- 1.6. AGAROSA**
- 1.7. ACIDO GLUCÓNICO**
  - 1.7.1 Industria Alimentaria**
  - 1.7.2 Industria Farmacéutica**
  - 1.7.3. Producción de Envases y Equipamientos**
  - 1.7.4 Usos Agropecuarios**
  
- 2. METODOLOGÍA**
  - 2.1. Glucosa Oxidasa (GOX) (EC 1.1.3.4.)**
  - 2.2. Unidades de Actividad Enzimática**
  - 2.3. Sustrato**
  - 2.4. Reacción Enzimática**
  - 2.5. Caracterización de la enzima libre**
    - 2.5.1. Efecto de la temperatura sobre la Actividad Enzimática**
    - 2.5.2. Efecto del pH sobre la Actividad Enzimática**
    - 2.5.3. Efecto de la concentración de sustrato sobre la Actividad Enzimática**
  - 2.6. Inmovilización de la Enzima**
    - 2.6.1. Alginato de Sodio**
    - 2.6.2. Determinación de la Concentración optima del Alginato de Sodio**
    - 2.6.3. Preparación de las esferas de Alginato de Sodio con Enzima atrapada**
  - 2.7. Determinación de la concentración optima del Gel de Agarosa**
    - 2.7.1. Preparación del Gel de Agarosa con enzima**
    - 2.7.2. Cuantificación de la enzima inmovilizada**
  - 2.8. Caracterización de la Glucosa Oxidasa inmovilizada en Alginato de Sodio**
    - 2.8.1. Efecto de la temperatura sobre la Actividad Enzimática**
    - 2.8.2. Efecto del pH sobre la Actividad Enzimática**
    - 2.8.3. Efecto de la concentración de sustrato sobre la Actividad Enzimática**
  - 2.9. Caracterización de la Glucosa Oxidasa inmovilizada en Gel de Agarosa**
    - 2.9.1. Efecto de la temperatura sobre la Actividad Enzimática**
    - 2.9.2. Efecto del pH sobre la Actividad Enzimática**

### **2.9.3. Efecto de la concentración de sustrato sobre la Actividad Enzimática**

## **3. ANALISIS DE RESULTADOS**

### **3.1. Caracterización de la Enzima Libre**

#### **3.1.1. Influencia de la temperatura sobre la Actividad Enzimática**

### **3.2. Inmovilización de la enzima**

#### **3.2.1. Determinación de la concentración óptima de alginato de sodio**

### **3.3. Influencia del pH sobre la Actividad Enzimática**

### **3.4. Influencia de la concentración de sustrato sobre la Actividad Enzimática**

### **3.5. Cinética enzimática de la Glucosa Oxidasa (GOX) libre**

#### **3.5.1. Linealización Km y Vm**

### **3.6. Cinética enzimática de la Glucosa Oxidasa (GOX) inmovilizada en alginato de sodio**

#### **3.6.1. Linealización Km y Vm**

### **3.7. Cinética enzimática de la Glucosa Oxidasa (GOX) inmovilizada en agarosa**

#### **3.7.1. Linealización Km y Vm**

## **4. Diseño Experimental**

## **CONCLUSIONES**

## **RECOMENDACIONES**

## **BIBLIOGRAFÍA**

## **GLOSARIO**

## **ANEXOS**

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus agradecimientos a:

A Dios por permitirnos alcanzar nuestra meta, concediéndonos la fuerza y el empeño necesarios para alcanzar nuestros propósitos.

A nuestro Director Yhon Flórez Guzmán, Ingeniero de Alimentos, MSc, muy especialmente por su constante orientación y guía en la culminación de este proyecto.

Claudia Cisneros, Harrison Corza Polanía, Gabriela Romero, Angélica María Yara y a Luis Domingo Galvis, por su desinteresada, eficiente y eficaz colaboración en la utilización de los laboratorios permitiendo la realización de los ensayos y obtener así los datos para el trabajo de grado.

A la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD) y a todos los docentes que brindaron sus conocimientos durante la carrera.

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Funciones y clasificación de las enzimas
<b>Tabla 2</b>	Nombres alternativos de la <i>Glucosa oxidasa</i>
<b>Tabla 3</b>	Cofactores de la <i>Glucosa oxidasa</i>
<b>Tabla 4</b>	Enzimas que requieren cofactores
<b>Tabla 5</b>	Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L libre e inmovilizada
<b>Tabla 6</b>	Efecto del ph sobre la actividad de la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L libre e inmovilizada
<b>Tabla 7</b>	Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de la enzima comercial Glucosa oxidasa Maxazyme 4000 L libre e inmovilizada
<b>Tabla 8</b>	Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de la enzima comercial Glucosa oxidasa Maxazyme 4000 L en agarosa inmovilizada
<b>Tabla 9</b>	Relación entre la concentración de sustrato y la actividad enzimática.
<b>Tabla 10</b>	Valores de actividad y sustrato de la enzima (GOX) inmovilizada en alginato de sodio.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura No. 1** Reacción de la Glucosa oxidasa
- Figura No. 2** Estructura química de la glucosa
- Figura No. 3** Fórmulas clásicas de las dos unidades monoméricas del ácido algínico
- Figura No. 4** Fórmulas en forma de silla
- Figura No. 5** Estructura química de la agarosa
- Figura No. 6** Estructura disacárido agarobiosa
- Figura No. 7** Estructura química del ácido glucónico
- Figura No. 8** Obtención de ácido glucónico

## LISTA DE GRAFICOS

- Gráfico No.1:** Efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L libre
- Gráfico No.2:** Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L inmovilizada en alginato de sodio.
- Gráfico No.3:** Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L inmovilizada en agarosa.
- Gráfico No.4:** Efecto del pH sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L libre
- Gráfico No.5:** Efecto del pH sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX 4000 L inmovilizada en alginato de sodio
- Gráfico No.6:** Efecto del pH sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L inmovilizada en agarosa
- Gráfico No.7:** Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L libre
- Gráfico No.8:** Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L inmovilizada en agarosa.
- Gráfico No.9:** Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L inmovilizada en alginato de Sodio
- Gráfico No.10:** Linealización de la relación entre sustrato ya actividad enzimática utilizando la Ecuación de Lineweaver Burk.
- Gráfico No.11:** Valores de actividad y sustrato de la enzima (GOX).

## ANEXOS

- Anexo A.** Ensayos de laboratorio
- Anexo B.** Ficha técnica de la enzima *Glucosa Oxidasa*
- Anexo C.** Diagrama preparación de la solución buffer 50 Mm.
- Anexo D.** Diagrama de la inmovilización de la enzima Glucosa Oxidasa en alginato de sodio.
- Anexo E.** Diagrama de la inmovilización de la enzima Glucosa Oxidasa en agarosa.

## RESUMEN

### **CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA (GOX) (EC 1.1.2.4.) LIBRE E INMOVILIZADA EN DOS SOPORTES (ALGINATO DE SODIO Y AGAROSA) PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO.**

El objetivo de este trabajo consiste en la caracterización de la enzima comercial glucosa oxidasa GOX EC(1.1.2.4) marca Maxazyme 4000 L de Novonordys libre e inmovilizada en dos tipos de soportes alginato de sodio y agarosa.

Inicialmente se caracterizó fisicoquímica y cinéticamente la enzima libre en cuanto a sus parámetros óptimos de pH, temperatura y concentración de sustrato, obteniendo unos valores de 5, 55°C y 0,22 M de glucosa como sustrato respectivamente. La enzima muestra un comportamiento Micheliano con un  $V_{max}$ : 714.2 y un  $K_m$  de 22.8 mM, por el método de Lineweaver Burk. Las condiciones óptimas de inmovilización en alginato fueron: 2% de alginato de sodio y 1.5% de cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ), con un tamaño de partícula y la concentración de agarosa fue del 3% p/v. Para la enzima inmovilizada en alginato y agarosa las condiciones de reacción óptimas son las siguientes: temperaturas: 50°C, 55°C, pH: 6 y 9, y una concentración de sustrato del 400 y 440 mM respectivamente.

## **DELIMITACIÓN DEL TEMA**

El presente trabajo consiste en la caracterización de la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L libre e inmovilizada en dos soportes (alginato de sodio y agarosa).

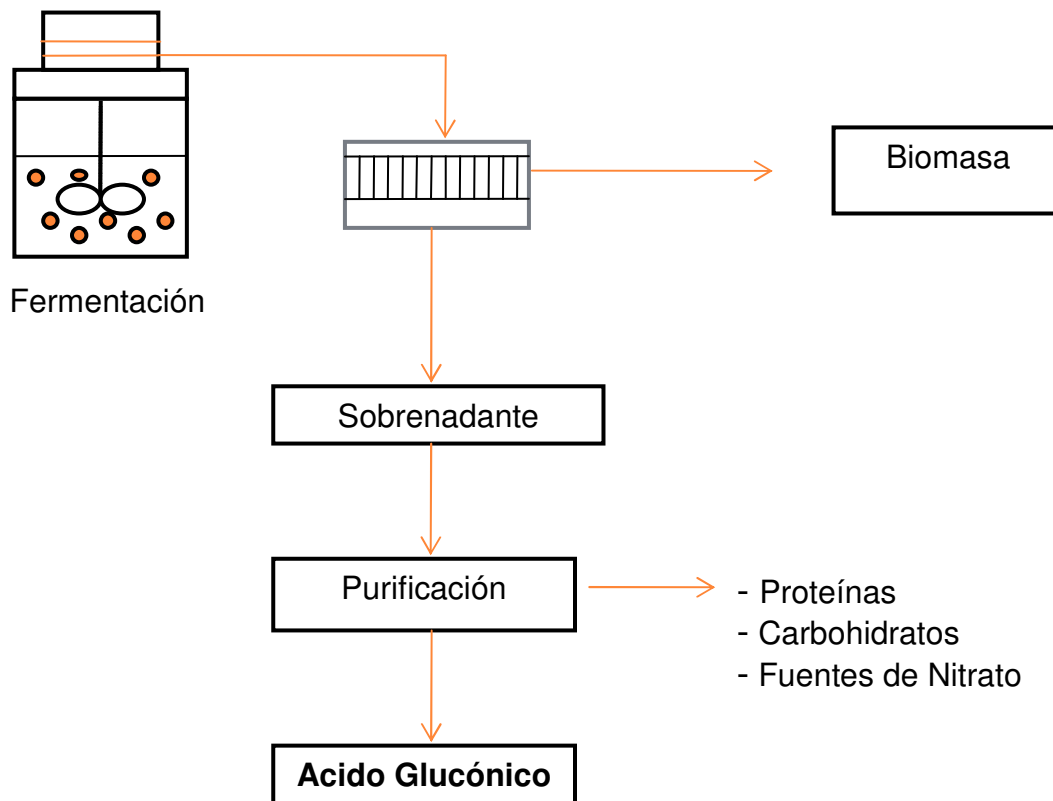
## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El ácido glucónico es un producto de gran demanda por su diversidad de aplicaciones a nivel industrial; por ejemplo en la industrial textil se usa para inhibir las precipitaciones en las fibras, en productos de higiene oral reemplaza al sorbitol y no produce caries, en la industria de alimentos es un regulador de la acidez, también imparte un sabor amargo a algunos zumos de frutas, vinagre y también es usado como complemento para alimentos dietéticos, pero el uso principal de este ácido es como agente de limpieza para la eliminación de depósitos de calcio en instalaciones de tratamiento y elaboración de cerveza y remover depósitos de oxido.

Mediante la caracterización e inmovilización de la enzima Glucosa oxidasa se pretende optimizar su producción, implicando una forma económica, segura, versátil y fácil de usar a gran escala. Para lograr esto es necesario conocer las condiciones de la enzima para un mejor aprovechamiento y un desarrollo de equilibrio cinético.

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente la producción de Acido Glucónico se obtiene mediante la fermentación en cultivos sumergidos del microorganismo *Aspergillus niger*. Separando la biomasa del sobrenadante, este a su vez es purificado de residuos extra celulares como proteínas, carbohidratos o fuentes de nitrato.



Basados en la inmovilización enzimática se busca una nueva alternativa de producción de Acido glucónico de una manera más limpia.

## APLICACIONES DEL ACIDO GLUCONICO EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

<p><b>ACIDO GLUCÓNICO</b></p>	<ul style="list-style-type: none"><li>❖ Regulador de la acidez en vinos, vinagre y zumos de frutas.</li><li>❖ Complemento en productos dieteticos.</li><li>❖ Productos para diabeticos: Gomas de mascar, chocolates, caramelos, mermeladas, bebidas y helados entre otros.</li><li>❖ Industria lactea para retardar la sedimentación en la leche.</li></ul>
-------------------------------	---

## INTRODUCCIÓN

Hoy día la biotecnología ha logrado grandes avances en diferentes áreas de la industria, aplicando procesos catalizados por las enzimas para obtener productos que marcan pautas significativas.

Uno de estos productos es el ácido glucónico, el cual se obtiene a partir de la glucosa mediante la enzima *Glucosa oxidasa*, y tiene muchas aplicaciones industriales. El propósito de este trabajo es caracterizar la enzima para optimizar su utilización y aprovechamiento, ya sea como enzima libre, o como enzima inmovilizada. La enzima inmovilizada se caracterizará en dos soportes (alginato de sodio y en agarosa).

El ácido glucónico es un ácido orgánico usado en la industria de alimentos como acidulante. Este ácido es un ingrediente muy versátil debido a su solubilidad, higroscopicidad, propiedades tampón (buffer) y de quelación. Es ampliamente usado en productos dietéticos. Tiene además muchos usos en la industria farmacéutica, agropecuaria y textil. Sus propiedades como quelante le permiten formar complejos solubles de iones metálicos en presencia de agentes químicos que normalmente producirían precipitados en soluciones acuosas. En productos de limpieza es utilizado como detergente. En productos de higiene oral reemplaza al sorbitol, gracias a que no produce caries.

Para su obtención industrial se utiliza la enzima Glucosa oxidasa inmovilizada, para ello se debe tener en cuenta los métodos de inmovilización que pueden ser activos, como por ejemplo la unión covalente de las enzimas o pasivos como la absorción de las enzimas. Como soportes de inmovilización se emplean una gran variedad de compuestos naturales o sintéticos, orgánicos o inorgánicos, que difieren en tamaño, forma, densidad y porosidad, y que se utilizan en forma de láminas, tubos, fibras, cilindros, o más popularmente esferas. El tamaño de partícula del soporte es un factor crucial puesto que determina la extensión de las restricciones de difusión de la actividad enzimática.

Generalmente no hay un método aceptado como el mejor para inmovilizar enzimas, es muy importante en la experimentación disponer de análisis por los que se comparen los métodos disponibles, debido a que la actividad, estabilidad y facilidad de uso de los biocatalizadores inmovilizados pueden variar enormemente y de forma imprescindible en función del método de inmovilización utilizado.

La inmovilización elegida debe ser reproducible, económica, segura, versátil y fácil de usar a gran escala. El método usado en realidad depende de una gran variedad de aspectos científicos, ingenieriles y económicos del proceso. La inmovilización utilizada debe permitir el control fácil de la cantidad de enzima y que esta no abandone el soporte a lo largo del almacenamiento. Para lograr esto es necesario conocer las condiciones de la enzima para un mejor aprovechamiento y un desarrollo de equilibrio cinético.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Caracterización de la enzima comercial glucosa oxidasa GOX libre e inmovilizada en dos soportes (alginato de Sodio y agarosa), para la producción de ácido glucónico.

### **OBJETIVOS EPECÍFICOS**

- Inmovilizar la enzima glucosa oxidasa GOX en dos soportes: alginato de sodio y agarosa.
- Caracterizar la enzima libre e inmovilizada, en cuanto a pH, temperatura y concentración de sustrato.

## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1. ENZIMOLOGÍA**

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores de procesos biológicos muy potentes y altamente selectivos tanto en el sustrato como en la acción. La principal función de una enzima consiste en disminuir la energía de activación para facilitar que una reacción química específica tenga lugar. Los factores que afectan la actividad de una enzima son: concentración de la enzima, concentración del sustrato, pH, y temperatura.

La enzima Glucosa oxidasa [EC 1.1.2.4] es una oxido-reductasa que cataliza la oxidación de la glucosa, reduciendo el oxígeno a peróxido de hidrógeno. Es una flava proteína que contiene FAD, y es altamente específica para -D-glucosa. Es producida por algunos organismos del reino fungi, y tiene actividad antibacterial en presencia de glucosa y oxígeno debido al peróxido de hidrógeno producido. Se usa para estimar la concentración de glucosa en la sangre o en la orina gracias a la formación de tintas coloreadas por el peróxido de hidrógeno.

#### **1.1.1. NOMENCLATURA Y CLASIFICACION DE LAS ENZIMAS**

Según la función que realizan las enzimas, éstas se clasifican en seis grupos:

Oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas o sintetetasas. De acuerdo con esta clasificación, para denominar una enzima se cita primero el nombre de un sustrato, a continuación el nombre de la coenzima, si la hay, y finalmente la función que realiza la enzima.

En la clasificación actual, cada enzima está numerada con cuatro cifras: la primera

indica la clase, la segunda la subclase, la tercera la subdivisión de la subclase y la cuarta es la específica de la enzima.<sup>1</sup>

**Tabla No. 1**

*Funciones y clasificación de las enzimas*

FUNCIONES Y CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS		
Clases	Función	Subclases más importantes
1. Oxidorreductasas	Reacciones de óxido – reducción	1.1 corresponde a las enzimas que actúan sobre >CH-OH
		1.2 actúan sobre >C=O 1.3 actúan sobre >C=CH- 1.4 actúan sobre >CH-NH <sub>2</sub> ,  1.6. Actúan sobre NAD <sup>+</sup> o NADP <sup>+</sup>
2. Transferasas	Transferencias de Grupos	2.1. Grupos de un átomo de C
		2.2. Grupos aldehídos o cetónicos
		2.7. Grupos fosfato
3. Hidrolasa	Hidrólisis	3.2. Enlaces glucosídicos
		3.4. Enlaces peptídicos
4. Liasas	Catalizan la separación de grupos químicos del sustrato por vía no hidrolítica ( <i>adición de grupos a dobles enlaces</i> )	4.1 actúan sobre enlaces >C=C<
		4.2 actúan sobre enlaces >C=O
		4.3 actúan sobre enlaces >C=NH
5. Isomerasas	Isomerización	5.1. Racemasas
6. Ligasas	Formación de Enlaces	6.1. Enlaces C – O
		6.3. Enlaces C – N
		6.4. Enlaces C – C

<sup>1</sup> [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)

## 1.2. CINETICA ENZIMATICA

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificada de la enzima. La medida se realiza siempre en las condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc., y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato. En éstas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ); la velocidad puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los reactivos.

Al seguir la velocidad de aparición de producto (o de desaparición del sustrato) en función del tiempo se obtiene la llamada curva de avance de la reacción. A medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato de la reacción; para evitar esta complicación se procede a medir la velocidad inicial de la reacción ( $V_0$ ).

La velocidad inicial de la reacción es igual a la pendiente de la curva de avance a tiempo cero. De esta forma la medida de ( $V_0$ ) se realiza antes de que se consuma el 10% del total del sustrato, de forma que pueda considerarse la  $[S]$  como esencialmente constante a lo largo del experimento. <sup>2</sup>(Peter and John. 1990).

### 1. 2.1. Enzima Micheliana

Las aplicaciones analíticas de las enzimas pasan por un mejor conocimiento de su comportamiento cinético. Un elevado número de enzimas monosustrato, siguen las pautas de un comportamiento cinético similar, que de forma totalmente empírica fue descrito por Michaelis-Menten. El conocimiento de la cinética enzimática permite un mejor aprovechamiento de las enzimas, tanto en el desarrollo de métodos de equilibrio como cinéticos. El mecanismo de las reacciones enzimáticas fue

---

<sup>2</sup> P Gasesa y J. Hubble, tecnología de las enzimas, Editorial Acribia. S.A., Segunda Edición, Zaragoza España, 1990.

interpretado por Michaelis y Menten. El caso más simple de reacción enzimática, implica la reacción de un sustrato (S) con un enzima (E) para formar el complejo activado (ES) el complejo se descompone originando el producto (P) y la enzima o bien se revierte hacia el sustrato.

### 1.2.2. Enzima Alostérica

De gran importancia en el fenómeno de la actividad enzimática es el hecho de que, en las proteínas, pueden existir dos (o cuando menos dos) sitios diferentes desde el punto de vista estereo-específico y que, además, estén en lugares distintos. Uno de estos sitios es el centro activo, donde el sustrato es atacado para dar origen a los productos de la reacción y por lo tanto donde reside el aspecto funcional de la proteína. El otro sitio se denomina sitio alostérico y en él puede acomodarse de manera complementaria - pero reversible - alguna sustancia llamada efector alostérico; al efectuarse esta unión se produce una alteración discreta de la estructura de la proteína, la transición alostérica, que modifica la actividad biológica de la proteína, porque altera la distancia, las propiedades del sitio activo. Es muy importante que el efector alostérico normal no tiene relación química o metabólica alguna con el sustrato de dicha enzima y que su acción tan específica se debe a que altera de tal modo la conformación de la proteína que modifica su centro activo.<sup>3</sup>

### 1.3. GLUCOSA OXIDASA

A partir de una cepa de *Aspergillus niger*, se prepara en el comercio una mezcla conteniendo una proporción considerable de esta enzima. Esta enzima es específica para la Glucosa la cual oxida con velocidades hasta 400 veces superiores que a otros azúcares; esta reacción es la base de algunas aplicaciones analíticas y médicas. Su actividad máxima está entre los 20 y los 45 °C con un pH entre 3.0 a 6.5 con un óptimo en 5,5 y se inactiva rápidamente a temperaturas superiores a 60°C.

---

<sup>3</sup> Cárdenas Eduardo. Enzimas alostéricas: cooperatividad en la unión y en catálisis. Ediciones H. Blume. Madrid 1978. Pág. 71 – 84.

**Tabla No. 2**

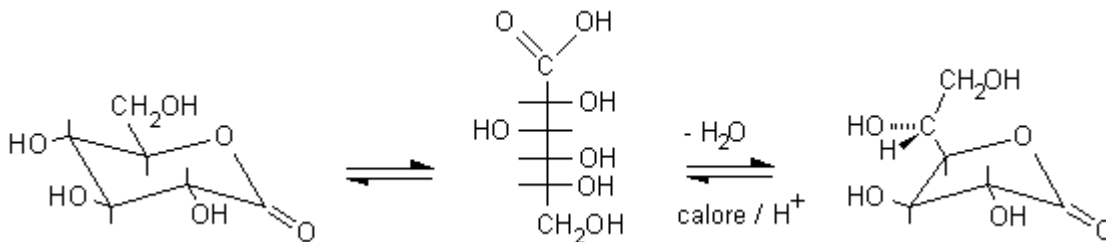
Nombres alternativos de la Glucosa oxidasa

NiceZyme View of ENZYME: EC 1.1.3.4

<b>Official Name</b>	Glucose oxidase.
<b>Alternative Names(s)</b>	- Glucosa oxyhydrase - Beta-D-glucose:oxygen 1-oxido-reductase - Glucosa aerodehydrogenase - D-Glucose-1-oxidase - Glucose oxyhydrase - Gox
<b>Reaction Catalysed</b>	Beta-D-glucose + O(2) <=> D-glucono-1,5 -lactone + H(2)O(2)

### 1.3.1. Reacción de la Glucosa oxidasa

La Glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa en ácido glucónico utilizando el oxígeno como aceptor de los electrones formando 2H<sub>2</sub>O.



**Figura No.1.** Reacción de la Glucosa oxidasa

### 1.3.2. Activadores de la Glucosa oxidasa

A diferencia de los catalizadores inorgánicos las enzimas actúan en condiciones moderadas de pH y temperatura. En su mayoría presentan especificidad por el sustrato aunque en grado variable, por ejemplo -*Glucosa oxidasa* una enzima presente en hongos y bacterias, cataliza la oxidación de D-glucosa a ácido glucónico, pero no oxida L-glucosa. La velocidad de oxidación de -D-glucosa es 157 mayor que la de oxidación de L-glucosa. La especificidad de esta enzima es de tal grado que diferencia los esteroisómeros.

Algunas enzimas necesitan de la presencia de componentes adicionales conocidos como cofactores para la actividad. El complejo enzima-cofactor, catalíticamente activo se denomina holoenzima y la proteína en ausencia del cofactor se denomina apoenzima.

Los cofactores pueden ser: iones inorgánicos, coenzimas y/o grupos prostéticos. Los iones metálicos inorgánicos pueden ser parte integral de la estructura de la enzima o pueden asociarse con el sustrato, ayudando a la unión con la enzima y aumentando la actividad catalítica. Por ejemplo el  $\text{Fe}^{+2}$  se encuentra asociado con el grupo hemo en la peroxidasa y la catalasa encontrándose fuertemente unido a la enzima, mientras que el  $\text{Mg}^{+2}$  se compleja con el ATP y es un componente esencial en las reacciones que involucran a esta molécula como aquellas catalizadas por fosfotransferasas.

El FAD es otro transportador de átomos de hidrógeno asociado con enzimas oxidantes como la Glucosa oxidasa. El grupo hemo de la catalasa y la peroxidasa con su anillo de porfirinas también se conoce como grupo prostético.

**Tabla No. 3**

*Cofactores de la Glucosa oxidasa*

<p><b>Cofactors</b> <b>FAD</b> <b>Flavin Adenin Dinucleótido</b></p>	
--	--

A continuación se enumeran un grupo de enzimas que requieren cofactores<sup>4</sup>.

**Tabla No. 4**

*Enzimas que requieren cofactores*

<b>Enzima</b>	<b>Clase</b>	<b>Cofactores</b>	<b>Tipo de cofactor</b>
Subtilisina (proteasa)	Hidrolasa	Ninguna	-----
Ácido láctico deshidrogenasa	oxidoreductasa	NAD <sup>+</sup>	Coenzima
<b>Glucosa</b> isomerasa	Isomerasa	Co <sup>+2</sup> ; Mg <sup>+2</sup>	Ion activador
Peroxidasa	Oxidoreductasa	Grupo hemo conteniendo Fe  +2	Grupo prostético
<b>Glucosa oxidasa</b>	Oxidoreductasa	FAD  Fe	Grupo prostético con activador

<sup>4</sup> [www.iqb.fcien.edu.uy/pdf/Repartido%20enzimas.pdf](http://www.iqb.fcien.edu.uy/pdf/Repartido%20enzimas.pdf)

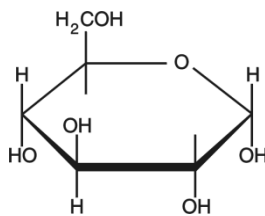
## 1.4. SUSTRATO

Un sustrato (bioquímica) es una molécula que experimenta una reacción, para la cual la presencia de una enzima baja la energía de activación. El sustrato ata con el sitio activo de la enzima, y la enzima provee de un camino de reacción alternativo una entalpía más baja de la entalpía de la activación.

La entalpía (simbolizada por H, también llamada “contenido de calor”) es la suma de la energía interna de un sistema. Al ocuparse de un sistema de gases es el producto de su volumen multiplicado por la presión. La entalpía es una función cuantificable del estado, y la entalpía total de un sistema no se puede medir directamente; el cambio de la entalpía de un sistema se mide en lugar de otro. La entalpía se puede aplicar solamente a un cuerpo en la presión constante.<sup>5</sup>

### 1.4.1. GLUCOSA

La **glucosa** es un monosacárido con fórmula empírica  $C_6H_{12}O_6$ , la misma que la fructosa pero con diferente posición relativa de los grupos  $-OH$  y  $O=$ . Es una hexosa, es decir, que contiene 6 átomos de carbono, y es una aldosa, esto es, el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula.



*Figura No. 2. Estructura química de la glucosa*

---

<sup>5</sup> Kirk, Raymond, Enciclopedia de Tecnología Química, Tomo VI, primera Edición, Editorial Uteha, España 1962.

Las propiedades de la Glucosa se explican por la presencia simultánea de un grupo característico aldehído y de un grupo característico de los alcoholes.

Es uno de los carbohidratos más importantes. Los carbohidratos (literalmente hidratos del carbón) son los compuestos químicos que actúan como los medios biológicos primarios de almacenar o de consumir energía, otras formas son las grasas y las proteínas. Los carbohidratos relativamente complejos se conocen como polisacáridos.

## **1.5. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA**

### **1.5.1 ALGINATO DE SODIO**

#### **1.5.1.1 Origen**

Sal sódica del ácido algínico, es un polisacárido de origen natural producido por diferentes algas de la familia *Phaeophyceae* (*Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *L. cloustoni*, *Ascophyllum nodosum*) en Estados Unidos y el Reino Unido.

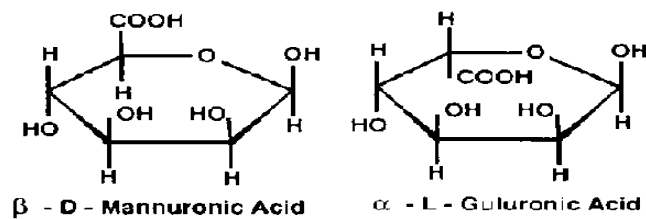
#### **1.5.1.2. Características**

Agente espesante y emulsificante.

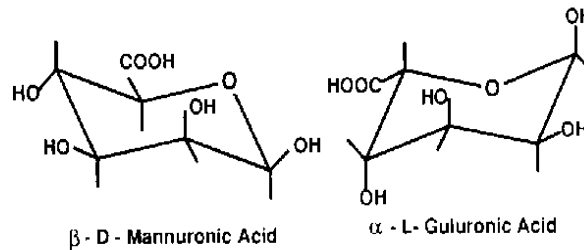
### **1.5.2 Estructura química de los alginatos**

Los alginatos son las sales del ácido algínico, polisacárido lineal constituido por dos unidades monoméricas, el ácido -D-manurónico (**M**) y el ácido -L-gulurónico (**G**). Estos se agrupan en bloques de secuencias **MM**, **MG**, unidos por enlaces glucosídicos (1-4); y bloques **GG**, **GM**, unidos por enlaces glucosídicos (1-4).

Las fórmulas clásicas de Haworth para los dos monómeros se muestran en la figura 3, mientras la figura 4 ilustra las llamadas fórmulas de silla que permiten ver en forma más clara el arreglo tridimensional de las moléculas:



*Figura No. 3. Fórmulas clásicas de las dos unidades monoméricas del ácido algínico*



**Figura No. 4.** Fórmulas en formas de silla

### 1.5.3 Propiedades de la solución de alginato de sodio

El alginato de sodio es soluble en agua fría y caliente. Esta solución de pH neutro es un líquido suave y viscoso.<sup>6</sup>

### 1.5.4. Efecto del Peso Molecular

La viscosidad de la solución acuosa de alginato de sodio depende directamente del peso molecular, es decir, del grado de polimerización del alginato de sodio.

### 1.5.5 Efecto de la concentración

La viscosidad de la solución acuosa de alginato de sodio aumenta logarítmica mente a medida que aumenta la concentración del alginato de sodio.

---

<sup>6</sup> [www.monografias.com/trabajos12/alginato/alginatos.html](http://www.monografias.com/trabajos12/alginato/alginatos.html)

### 1.5.6. Efecto de la temperatura

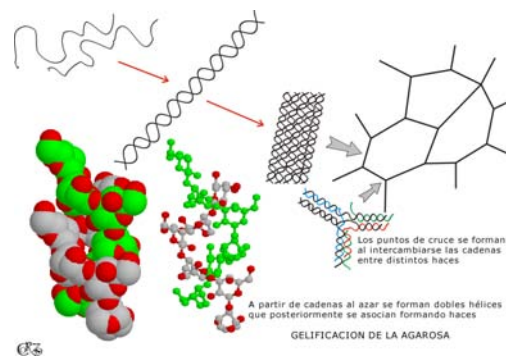
La viscosidad de la solución de alginato de sodio disminuye a medida que aumenta la temperatura. La temperatura no tiene mayores incidencias en las propiedades de congelación / descongelación. Su viscosidad es muy sensible a la temperatura.

### 1.5.7. Efecto del pH

El descenso del pH de la solución provoca la transición del anión de alginato soluble en un ácido algínico insoluble y se traduce en una mayor viscosidad. A un pH 2,0 o menor, el ácido algínico precipita.

## 1.6 Agarosa

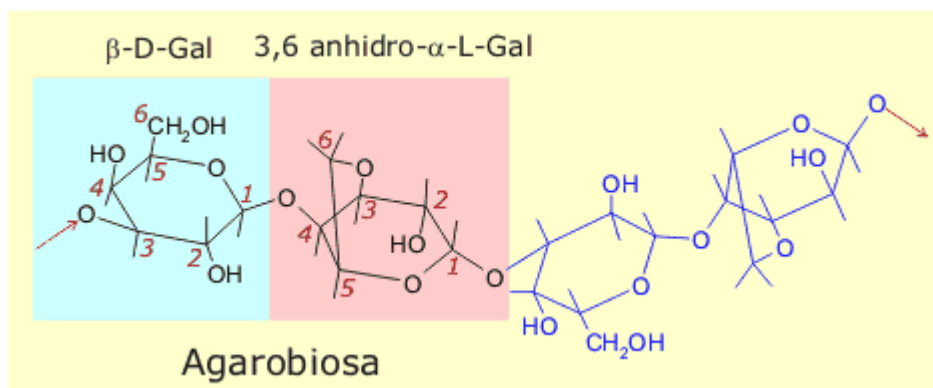
La agarosa está compuesta de cadenas de azúcares y tiene una consistencia similar a la de la gelatina cuando se utiliza para este propósito. La agarosa es un polisacárido que no interacciona químicamente con la mayor parte de las proteínas.



*Figura No.5. Estructura química de la agarosa*

Es un polímero lineal formado por la repetición de unidades del disacárido agarobiosa, cuya estructura es:

-(1-3)--D-Galactosa-(1-4)[3,6 anhidro]--L-galactosa-

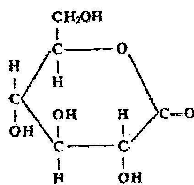


*Figura No. 6. Estructura Disacárido agarobiososa*

Para obtener un gel de agarosa se mezcla agitando de forma continua un volumen apropiado de disolución buffer con el polvo de agarosa para obtener un gel de agarosa. Se calienta la mezcla hasta que hierve para así romper los enlaces entre las fibras de agarosa.

### 1. 7. Acido glucónico

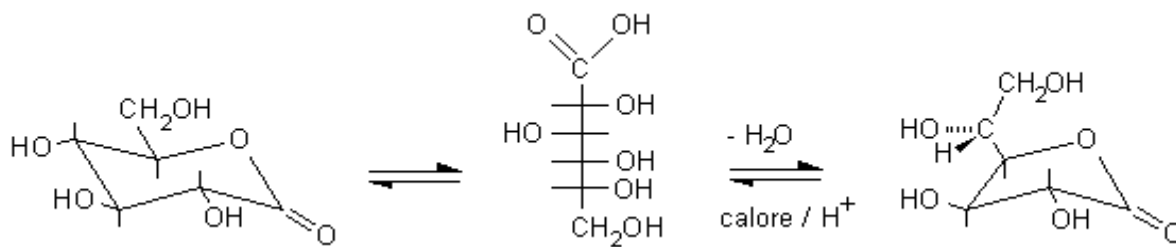
El ácido glucónico ( $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{COOH}$ ) es un ácido hidrocarboxílico óptimamente activo. Es el ácido carboxílico correspondiente a la Glucosa (azúcar tipo aldosa).<sup>7</sup>



*Figura No. 7. Estructura química del ácido glucónico*

El ácido glucónico se fabrica también haciendo uso de los sistemas enzimáticos del *Aspergillus niger*, pero el proceso es mucho más simple, ya que la reacción consiste solamente en convertir el grupo aldehído terminal de la glucosa en un radical carboxilo.

<sup>7</sup> Diccionario Química Oxford Univeristy 1.997



**Figura No. 8.** Obtención de ácido glucónico

Debido a que esta reacción no depende del crecimiento de los microorganismos, sino solamente de la disponibilidad de la enzima específica, el micelio puede ser recirculado extensivamente y suspendido en concentraciones muy altas de glucosa.

Es posible usar hasta el 30% de concentración en presencia de cantidades limitadas de  $\text{SO}_4\text{Mg}$ ,  $\text{PO}_4\text{H}_2$  y  $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$  más  $\text{CO}_3\text{Ca}$  en exceso como regulador del pH.

Esta última sustancia produciría normalmente un precipitado de gluconato de calcio, pero puede ser inhibido por acción del bórax. Se emplean pequeñas cantidades de ácido glucónico en preparados antianémicos de gluconato ferroso, pero el uso principal es como agente de limpieza y separador. En este sentido se usa en operaciones de limpieza y moldeado en las industrias del metal y también para eliminar depósitos en instalaciones de tratamientos de leche y elaboración de cerveza.

El ácido glucónico está presente en forma natural y es producido por fermentación con *Aspergillus niger* o *Gluconobacter suboxydans* a partir de glucosa y también por medio de la inmovilización de la enzima *Glucosa oxidasa*. Este es un ácido orgánico y se usa por lo general en:

### 1.7.1. Industria alimentaria:

- El ácido glucónico es un ácido orgánico hidroxilo – carboxílico y se usa por lo general como acidulante capaz de comunicar un pH ácido o intensificar el sabor ácido o disminuir el pH alcalino de los alimentos y bebidas, es uno de los

ingredientes más versátiles debido a su solubilidad, higroscopicidad, propiedades tampón ( buffer) y de quelación<sup>8</sup>. Esta última es la que forma complejos solubles de iones metálicos en presencia de agentes químicos que normalmente producirían precipitados en soluciones acuosas.

- Es usado para la higiene y limpieza para eliminar residuos de los productos y suciedades que contengan microorganismos que constituyan una fuente de contaminación de los productos; dentro de la clasificación de los detergentes encontramos los detergentes ácidos (ácido glucónico) considerados excelentes en la práctica sanitaria en la limpieza de tanques de almacenamiento, clarificadores, tanques de pesaje y otros equipos y utensilios. El uso de este detergente alternado con soluciones alcalinas logra la eliminación de olores indeseables y disminución de la cuenta microbiana, además corroe el estaño y el hierro menos que el ácido cítrico, tartárico y fosfórico. Las propiedades del detergente ácido son: Completa y rápida solubilidad, no ser corrosivo a superficies metálicas, brindar completo ablandamiento del agua, o tener capacidad para acondicionar la misma, excelente acción humectante, excelente acción emulsionante de la grasa, excelente acción solvente de los sólidos que se desean limpiar, excelente dispersión o suspensión, excelentes propiedades de enjuague, acción germicida, no tóxico.
- Partiendo del ácido glucónico se produce el xilitol, cuyo procedimiento consiste en la transformación del mismo en arabinosa, hidrogenación de la misma formándose arabitol, isomerización de este último a una mezcla de pentitales y posterior separación de los mismos. El xilitol se usa como edulcorante, principalmente:
- En alimentos dietéticos: Productos para diabéticos: gomas de mascar, chocolates, caramelos, jaleas, dulces, mermeladas, bebidas, helados.

---

<sup>8</sup> Moresi y Parente, 1999.

- En preparaciones farmacéuticas – pastillas, tabletas, jarabes y en soluciones para uso parenteral.
- Para la alimentación parenteral es una fuente alternativa a la dextrosa por el hecho que el xilitol no es insulino - dependiente. Ofrece además la ventaja que, por esterilización con calor, las soluciones no se coloran.<sup>9</sup>

### **1.7.2. Industria farmacéutica:**

Debido a su baja higroscopicidad y buena compresibilidad así como al bajo punto de fusión es muy útil en la preparación productos farmacéuticos. Además sus sales o sus esteres son usados como materia prima en los medicamentos preparados para usos terapéuticos o profilácticos.

### **1.7.3. Producción de envases y equipamientos:**

El ácido glucónico es una sustancia auxiliar y funciona como un agente estabilizante de fijación y apergaminante usado en la producción de envases y equipamientos celulósicos en contacto con alimentos destinados a entrar en contacto con alimentos y materias primas para alimentos, inclusive aquellos materiales celulósicos revestidos o tratados superficialmente con parafinas, resinas poliméricas y otros. Se aplica también a envases y equipamientos de uso doméstico, elaborados o revestidos con papel y cartón, o envases compuestos por varios tipos de materiales, siempre que la cara en contacto con el alimento sea celulósica.

---

<sup>9</sup> [www.capitulo8/limpieza.htm](http://www.capitulo8/limpieza.htm)

#### **1.7.4. Usos agropecuarios:**

Para la producción agrícola existen productos químicos que contienen ácido glucónico los cuales ayudan a la prevención y corrección de carencias de calcio en la tierra, corrector de suelos salinos y corrector de suelos sódicos. Las funciones del calcio en la planta son importantes, pues intervienen en el crecimiento de las raíces, transporte de carbohidratos y proteínas así como proporcionan la consistencia de las plantas y combaten las diferentes fisiopatías relacionadas con el calcio como el Bitter-pit en manzanas, rajado en cítricos y cerezas y necrosis apical en tomate y pimiento, tipburn en fresa, corazón negro en remolacha, lechuga, etc.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 . Glucosa Oxidasa (GOX) (EC 1.1.2.4.)

La enzima utilizada, es una Glucosa oxidasa comercial, nombrada como Maxazyme 4000 L, obtenida por fermentación con *Aspergillus niger*. El extracto enzimático es una mezcla de dos tipos de enzimas: Glucosa oxidasa y catalasa. Ver anexo A.

### 2.2. Unidades De Actividad Enzimática (U)

La unidad de actividad enzimática fue definida como:

Es la cantidad de enzima necesaria para causar una disminución de 0.1 unidades de pH por minuto, a una temperatura de 55°C, un pH inicial de 5 y una concentración de glucosa como sustrato del 0,11 M.

### 2.3 . Sustrato

El sustrato utilizado fue glucosa anhidra, grado analítico. La solución se preparó, a una concentración de 0,11 M, en buffer fosfatos 50 mM a pH 5.

### 2.4. Reacción Enzimática

La reacción enzimática se realizó en un vaso de precipitado, conteniendo 5 ml de la solución del sustrato (numeral 2.3) donde se calentó a una temperatura de 55 °C por un tiempo de 10 minutos, utilizando un baño termostatado; luego se adicionó 50 µl (0.45 U, relación 4,54 U/g de glucosa), de la solución enzimática en una relación (100:1) con respecto al sustrato; se midió la variación del pH cada minuto durante diez minutos, tomando como tiempo cero el momento de adición de la enzima.

### 2.5 . Caracterización de la Enzima Libre

En cuanto a la caracterización de la enzima GOX en estado libre se determinó el efecto de la temperatura, pH y concentración de sustrato sobre su actividad enzimática.

#### 2.5.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

La temperatura óptima se determinó por mezclas de reacción igual que las utilizadas para los ensayos de actividad enzimática (numeral 2.4). Los valores evaluados fueron: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 °C.

## **2.5.2 Efecto del pH sobre la actividad enzimática**

Los valores de pH evaluados fueron 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, utilizando buffer fosfatos 50mM. A cada uno de los ensayos se le midió actividad enzimática, manteniendo la cantidad de enzima constante. Los ensayos de actividad, se realizaron de acuerdo al numeral 2.4.

## **2.5.3 Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática**

La influencia de la concentración inicial de sustrato en la reacción enzimática se evaluó, variando el contenido de glucosa inicial en 0,0; 0,05; 0,11; 0,22; 0,33 y 0,44. Molar. Los ensayos de actividad, se realizaron de acuerdo al numeral 2.4.

## **2.6 Inmovilización De La Enzima**

### **2.6.1. Alginato De Sodio**

La inmovilización de la enzima en alginato de sodio, es posible por las propiedades químicas de formación de gel, en presencia de iones calcio. Se utilizó una mezcla de alginato de sodio grado USP y enzima; la polimerización se realizó por goteo sobre una solución de cloruro de calcio.

### **2.6.2. Determinación de la concentración óptima de alginato de sodio**

Se realiza una matriz experimental variando las concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) en 1, 1.5, 2.0, 2.5, y 3.0 % P/V de ambos reactivos.

Para cada ensayo se prepara 5ml de una solución en agua destilada de Alginato de Sodio a las diferentes concentraciones; conteniendo 200 $\mu$ l de enzima (1.8 U). 0.2gr de esta solución se adicionó en 800 $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$ , de las diferentes concentraciones se llevan a uno micro tubos de 1.5 ml, se centrifuga a 2000 rpm x 5 minutos, al sobrenadante como a la enzima inicial, se determinó concentración de proteína utilizando el método de Keldahl. La diferencia entre la concentración de proteína inicial y la concentración de sobrenadante indica la cantidad de enzima inmovilizada.

### **2.6.3. Preparación de las esferas de alginato de sodio con enzima atrapada**

La mezcla de enzima y alginato se efectua tomando 20 ml de buffer fosfato 50mM a pH 5 en un vaso de precipitado, se agregaron 0.6 g de alginato de sodio ( 2% p/v) y 1 ml de la enzima comercial Glucosa oxidasa (Gox) (9U). Se agitó suavemente hasta su disolución completa. Parte de la mezcla se introdujo en una jeringa de 5 ml.

En otro vaso de precipitado se prepara una solución de 100 ml de  $\text{CaCl}_2$  al 1.5% P/V. Utilizando la jeringa, se adiciona por goteo la solución de alginato de sodio en la solución de  $\text{CaCl}_2$ , formándose las esferas y atrapando la enzima; Las esferas se recuperan por filtración y se lavan con agua destilada.

## **2.7. Determinación de la concentración óptima del gel de agarosa**

Se realizan pruebas cualitativas variando la concentración de agarosa al 2%, 3% y 4%, se toma 50ml de agua destilada en un vaso de precipitado se adiciona la agarosa de acuerdo al porcentaje a analizar, se lleva la muestra a temperatura de ebullición por 2 minutos, se deja enfriar y se vierte en un molde rectangular plástico, formando una película de 3mm de espesor, se observa la textura del gel por tacto.

### **2.7.1. Preparación del gel de agarosa con enzima**

En un vaso de precipitado se toman 20ml buffer fosfato 50mM a pH 5 y se agregan 0.8 g de agarosa (3% p/v), se lleva a ebullición por 3 minutos, se deja enfriar hasta alcanzar una temperatura de 40 - 45 °C evitando su polimerización; en estas condiciones se adiciona 1 ml de la enzima comercial (9U), se mezcla y se vierte en un molde plástico formando una película de 3 mm de espesor, se cortan pequeños cubos de 27 mm<sup>3</sup>, se filtran y lavan con agua destilada.

### **2.7.2. Cuantificación de la enzima inmovilizada**

Para analizar los ensayos de actividad se determina la relación peso enzima inmovilizada sobre volumen enzima libre. Bajo esta relación se determina el peso de enzima inmovilizada correspondiente a 50µl de enzima libre.

## **2.8. Caracterización de la glucosa oxidasa inmovilizada en alginato de sodio**

Se determina la influencia de la temperatura (°C), pH y la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de la enzima inmovilizada en alginato de sodio.

### **2.8.1. Efecto de la temperatura (°C) sobre la actividad enzimática**

La temperatura óptima se determina por mezclas de reacción igual que las utilizadas para los ensayos de actividad enzimática (numeral 2.4) utilizando enzima inmovilizada, manteniendo la relación de actividades igual a los de la enzima libre (0.45U). Las temperaturas evaluadas fueron: 30, 40, 50 y 60 °C.

### **2.8.2. Efecto del pH sobre la actividad enzimática**

Los valores de pH evaluados fueron 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, utilizando buffer fosfatos 50mM. A cada uno de los ensayos se le midió actividad enzimática, manteniendo la

cantidad de enzima inmovilizada constante (0.45 U).

### **2.8.3. Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática**

Para el análisis del efecto del sustrato inicial sobre la actividad de la enzima inmovilizada, se evaluaron las concentraciones de glucosa: 0,0; 0,05; 0,11; 0,22; 0,33; 0,44; 0,55; 0,83. Molar.

## **2.9. Caracterización de la glucosa oxidasa inmovilizada en gel de agarosa**

Se determina el efecto de la temperatura (°C), pH y la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de la enzima inmovilizada en agarosa.

### **2.9.1. Efecto de la temperatura (°C) sobre la actividad enzimática**

La temperatura óptima se determina por mezclas de reacción igual que las utilizadas para los ensayos de actividad enzimática (numeral 2.4) utilizando enzima inmovilizada, manteniendo la relación de actividades igual a los de la enzima libre (0.45U). Las temperaturas evaluadas fueron: 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70 y 80°C

### **2.9.2. Efecto del pH sobre la actividad enzimática**

Los valores de pH a evaluar son 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, utilizando buffer fosfatos 50mM. A cada uno de los ensayos se le mide actividad enzimática, manteniendo la cantidad de enzima inmovilizada constante (0.45 U).

### **2.9.3. Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática**

Para el análisis del efecto del sustrato inicial sobre la actividad de la enzima inmovilizada, se evalúan las concentraciones de glucosa: 0,0; 0,05; 0,11; 0,22; 0,33; 0,44; 0,55; 0,83 Molar.

### 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

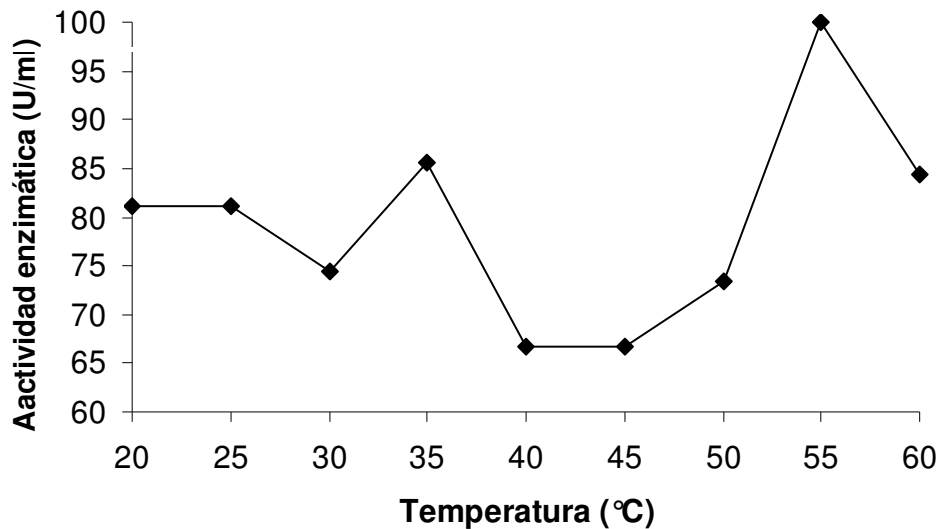
#### 3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA LIBRE

##### 3.1.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla No.1 y gráficas No.1, 2 y 3

**Tabla 5.** Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L, libre e inmovilizada

Temperatura (°C)	Actividad (U/ml)		
	Enzima Libre	Enzima en alginato	Enzima en agarosa
20	7,37		
25	7,37		
30	6,77	1,41	
35	7,78		2,52
40	6,06	3,23	2,32
45	6,06		
50	6,67	3,33	3,33
55	9,09		8,68
60	7,68	0,00	2,52
70			4,04
80			0,00



**Gráfico 1.** Efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L libre. Las condiciones de la reacción fueron: Buffer fosfatos 50 mM a pH 5 y una concentración de sustrato (glucosa) de 0.11 M. Se mantuvo la relación enzima – sustrato en 4,54 U/g de glucosa.  $n = 3$   $\delta=0.09$

La Glucosa oxidasa Gox (Maxazyme 4.000L) presenta su máxima actividad enzimática a una temperatura de 55 °C.

Cuando se incrementa la temperatura, también ocurre un aumento de velocidad de reacción, al llegar al pico 1, sucede el descenso causado por la desnaturalización de la enzima. Este comportamiento se ocasiona por el aumento de energía cinética de las moléculas reactantes, al llegar a 57°C los enlaces débiles (de hidrógeno) que conservan su estructura secundaria y terciaria de la enzima se rompen, por consiguiente, a esta temperatura predomina una pérdida precipitada de actividad catalítica.<sup>1</sup>

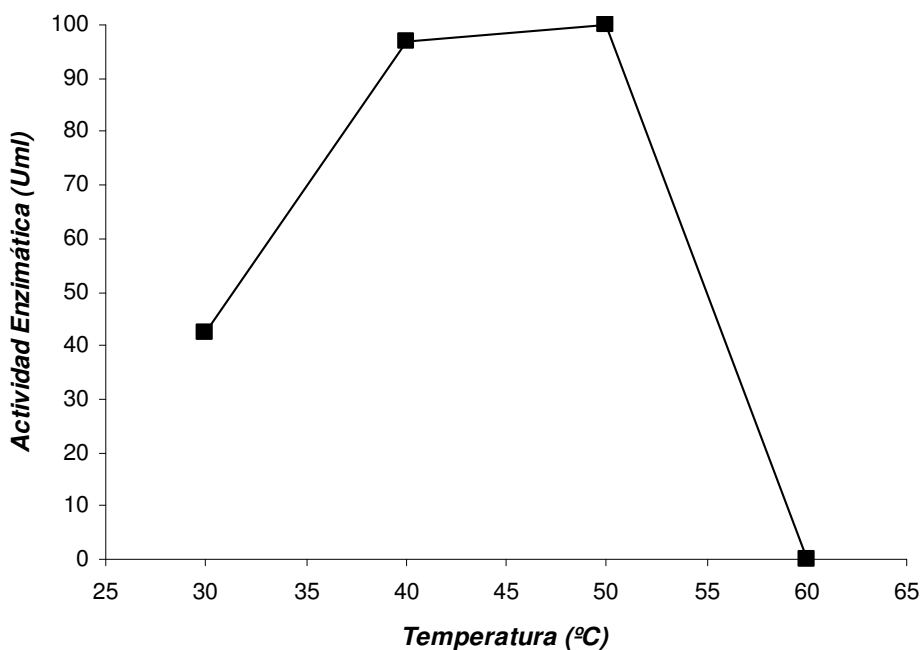
En la (Gráfica 1) se observa un incremento rápido en la actividad; (5,32% en su actividad por grado centígrado o sea un total de 26.6%), en tanto que el descenso es menor (disminuye 1,82% por grado centígrado en total 9.1%).

En la ficha técnica de la enzima comercial GLUCOSA OXIDASA MAXAZYME 4000 L establece que la temperatura óptima para su activación oscila entre 20 y 45°C, esto implica que la estabilidad de esta enzima muestra una temperatura óptima superior a la de la ficha técnica. La enzima se inactiva rápidamente a temperaturas superiores a 60°C, tal como se podría predecir dado su naturaleza proteica.

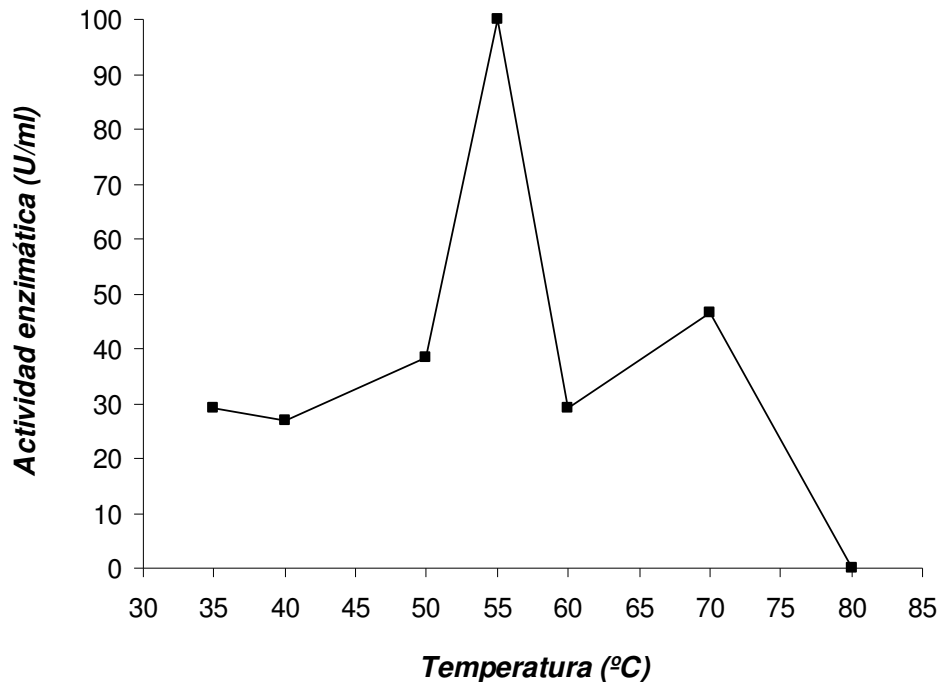
La teoría cinética química de Arrhenius; dice que el efecto de las temperaturas de 40°C hasta 45°C será por lo general positivo sobre la velocidad de reacción, por encima de 45°C la velocidad alcanza rápidamente un límite variable según la enzima considerando

raramente superior a 80°C. Lo que nos indica que en la actividad enzimática de la enzima libre a temperaturas de 40- 45 °C muestra una actividad del 66.7%

La Glucosa oxidasa Gox (Maxazyme 4.000L) permite su utilización en condiciones prolongadas de operación pues los rangos de estabilidad de la enzima abarca desde 35 hasta 55 °C., los resultados también dependen del sustrato que puede ejercer un efecto estabilizante sobre la enzima al formarse el complejo ES<sup>ii</sup>. Para el sistema sustrato glucosa y enzima Glucosa oxidasa Gox (Maxazyme 4.000L) el rango recomendable de temperatura para su estabilidad, está ubicado entre los puntos (53 °C y 58 °C).



**Gráfico 2:** Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L inmovilizada en alginato de sodio. Las condiciones de la reacción fueron: Concentración de alginato 3% p/v, buffer fosfatos 50 mM a pH 5 y una concentración de sustrato (glucosa) de 0.11 M. Se mantuvo la relación enzima – sustrato en 4,54 U/g de glucosa n=2.  $\delta=0.05$



**Gráfico 1.** Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L inmovilizada en agarosa. Las condiciones de la reacción fueron: Concentración de agarosa 3% p/v, buffer fosfatos 50 mM a pH 5 y una concentración de sustrato (glucosa) de 0.11 M. Se mantuvo la relación enzima – sustrato en 4,54 U/g de glucosa.  $n=2$   $\delta=0.07$

Según la grafica No.1, a temperaturas de 20, 25, 30°C la enzima libre muestra una actividad enzimática estable y a los 35°C aumenta su actividad a un 85,6% pero siendo la temperatura óptima de 55°C, donde su actividad fue del 100%.

En la grafica No.2 la influencia de la temperatura en la enzima GOx inmovilizada en alginato de sodio a los 40°C alcanza una actividad enzimática del 97% donde su temperatura optima es a los 50°C su actividad es del 100%.

En la grafica No.3 la influencia de la temperatura en la enzima GOx inmovilizada en agarosa alcanza un 100% de actividad a una temperatura de 55°C haciendo un descenso en la temperatura de 60°C con un 29% de actividad y a los 70°C muestra un ascenso con una actividad del 46,5%.

En la ficha técnica de la enzima comercial GLUCOSA OXIDASA MAXAZYME 4000 L

establece que la temperatura óptima para su activación oscila entre 20 y 45°C, esto implica que la estabilidad de esta enzima muestra una temperatura óptima superior a la de la ficha técnica.

La enzima se inactiva rápidamente a temperaturas superiores a 60°C, tal como se podría predecir dado su naturaleza proteica.

La teoría cinética química de Arrhenius; dice que el efecto de las temperaturas de 40°C hasta 45°C será por lo general positivo sobre la velocidad de reacción, por encima de 45°C la velocidad alcanza rápidamente un límite variable según la enzima considerando raramente superior a 80°C. Lo que nos indica que en la actividad enzimática de la enzima libre a temperaturas de 40- 45 °C muestra una actividad del 66.7% y en la actividad de la enzima inmovilizada con alginato de sodio muestra una similitud con esta teoría, y con la enzima inmovilizada con agarosa igualmente muestra un ascenso positivo sobre la velocidad de reacción.

### 3.2. Inmovilización De La Enzima

#### 3.2.1. Determinación de la concentración óptima de alginato de sodio

**Tabla 6. Eficiencia de inmovilización (%) con respecto a la concentración de proteína no atrapada en diversas combinaciones de alginato con cloruro de calcio.** Número de replicas n: 2,  $\delta = 0.08$

Cloruro de calcio (%)	Alginato de sodio (%)				
	1	1.5	2	2.5	3
1	20,5	51,5	59,5	48,3	59,5
1.5	34,3	57,8	72,0	53,0	63,8
2	54,8	48,5	57,8	56,0	68,5
2.5	57,8	53,3	56,3	53,0	56,3
3	32,8	51,5	32,5	18,5	61,0

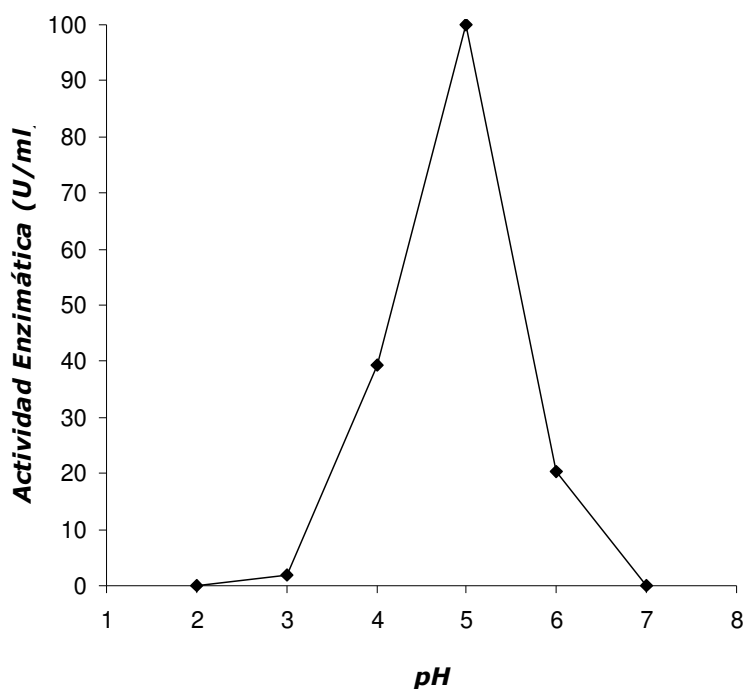
La eficiencia es la relación entre la proteína total destinada a inmovilizar y la proteína libre no atrapada. %E:  $100 - (100/C_1)C_2$ , donde  $C_1$ : Concentración de proteína total,  $C_2$ : concentración de proteína libre(sin atrapar)

Según estos resultados la mayor eficiencia en la inmovilización, se encuentra con un 2% p/v de alginato de sodio y 1.5 % de cloruro de calcio  $CaCl_2$ .

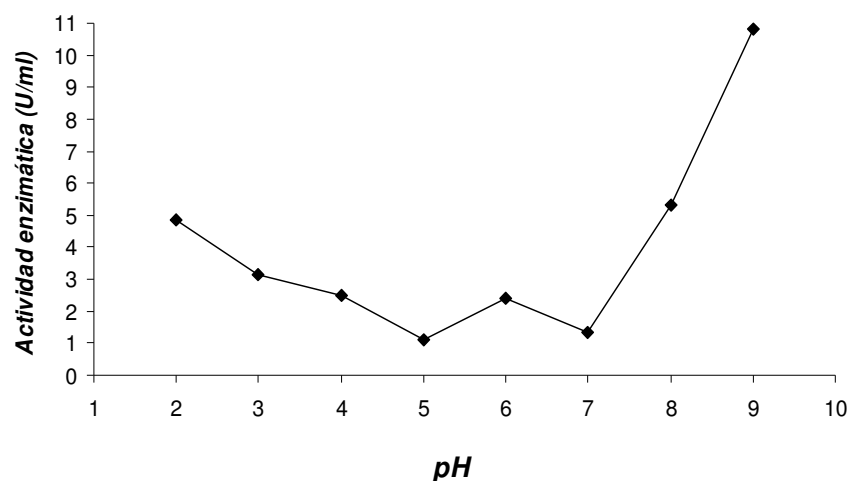
### 3.3 Efecto del pH sobre la actividad enzimática

**Tabla 7.** Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme L 4000 inmovilizada en agarosa

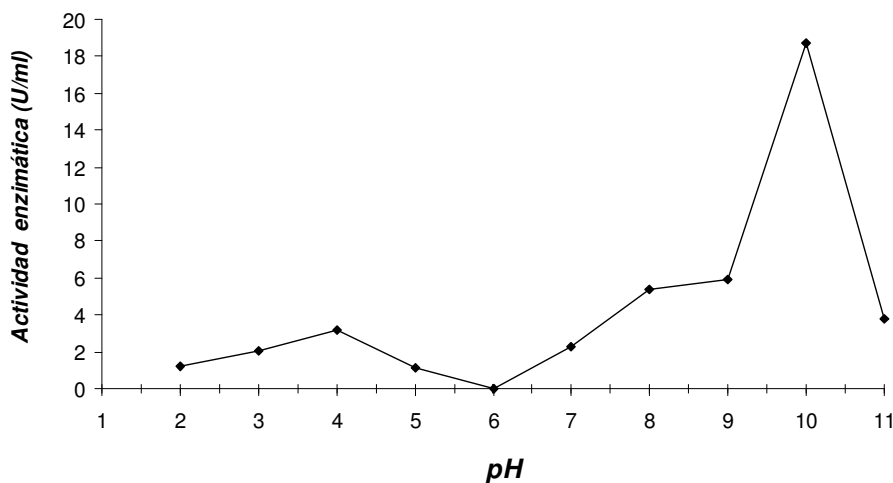
pH	Actividad U/ml		
	Enzima Libre	Enzima en Alginato	Enzima en Agarosa
2	0,00	4,87	1,19
3	0,10	3,12	2,07
4	2,02	2,47	3,17
5	5,15	1,10	1,10
6	1,01	2,38	0,00
7	0,00	1,33	2,29
8		5,32	5,41
9		10,84	5,87
10			18,68
11			3,80



**Gráfico 4:** Efecto del pH sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L libre bajo los parámetros de temperatura a 55°C y Concentración de Sustrato 0.11M n=3  $\delta = 0.11$



**Gráfico 5:** Efecto del pH sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX 4000 L inmovilizada en alginato de sodio bajo los parámetros temperatura 50°C y concentración de sustrato [8] , 0,44M , n=2 ,  $\delta=0.03$



**Gráfico 6:** Efecto del pH sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L inmovilizada en agarosa bajo los parámetros temperatura 55°C y concentración de sustrato 0.44M, n =2 ,  $\delta= 0.10$

En la grafica No. 4 observamos que a pH 4 alcanza un 39,2 % de actividad aumentando notablemente a un pH de 5 obteniendo un 100% de actividad y desciende su actividad a 19,6% que corresponde a pH 6.

La Actividad enzimática de la enzima Gox inmovilizada en Alginato de Sodio (grafica

No.5) nos indica que a pH 2 se obtiene una actividad de 44,9% y a pH 3, 4 y 5 desciende notablemente y a pH 9 alcanza su máxima actividad.

La grafica No.6 de la influencia del pH sobre la actividad enzimática de la enzima GOx inmovilizada en agarosa nos muestra que la velocidad de reacción en pH 2, 3 y 4 aumenta lentamente y disminuye en pH 5 y 6, retornando notablemente su velocidad hasta alcanzar el 100% en el pH 10.

De acuerdo a la ficha técnica de la enzima comercial *Glucosa oxidasa* MAXAZYME 4000 L, indica que el rango del pH para su activación oscila entre 3 – 6,5. Esto implica que el pH obtenido en la actividad de la enzima libre se encuentra dentro del rango lo cual puede deberse a que la afinidad del sustrato por la enzima sea el adecuado.

En las inmovilizaciones realizadas de la enzima en alginato de sodio (pH 9) y agarosa (pH 10) se observa que durante el proceso de caracterización de la enzima aumentó la actividad enzimática, tal vez debido a la desnaturalización por el calor y/o cambios de pH generados durante el proceso. Sin embargo, en algunos casos estos efectos han demostrado ser útiles, por ejemplo cuando la enzima deseada resiste las condiciones de desnaturalización.

Las causas de que la actividad decaiga a ambos lados del pH óptimo puede ser debido a:

- El hecho de que la enzima, el sustrato y/o el complejo enzima- sustrato se encuentren mayoritariamente en una forma iónica no activa.
- Que el pH afecte la actividad de la enzima, ocurriendo desnaturalización irreversible
- Combinación de ambos efectos.<sup>10</sup>

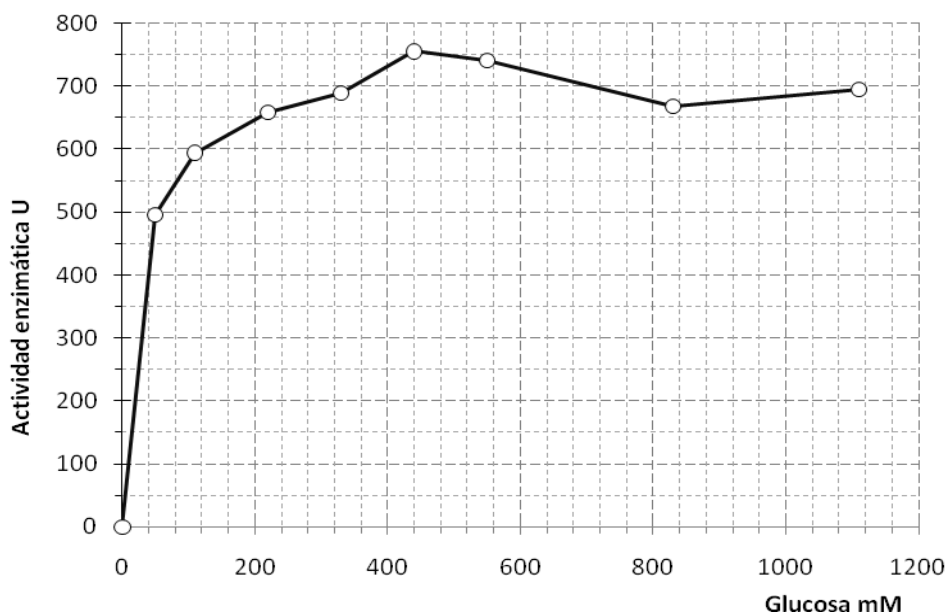
---

<sup>10</sup> Enzimas-campos de aplicación. En: Folleto Técnico de Novo-Nordisk a/s (1989). Dinamarca. Teal, A. R., y Wymer, P., En: Enzymes and their role in biotechnology; <http://www.biochemistry.org/education/basc03.htm>

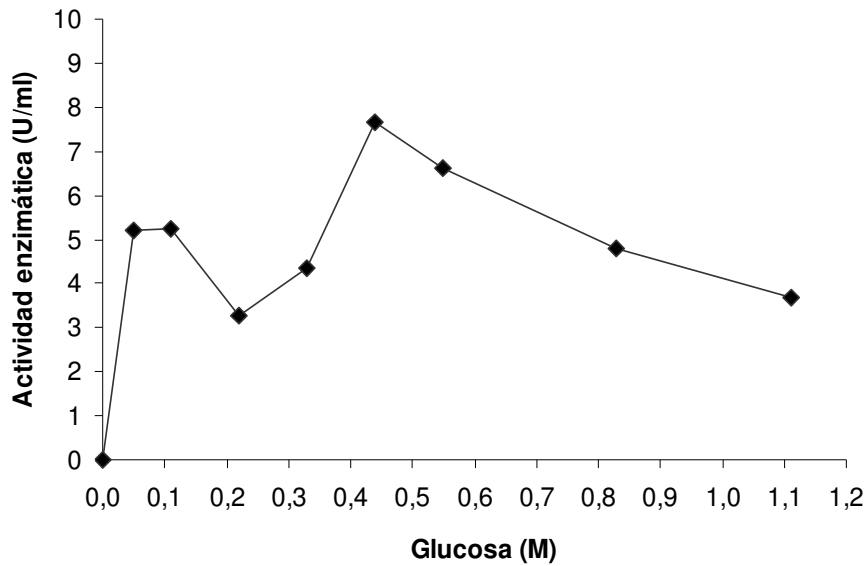
### 3.4 Influencia de la concentración sustrato sobre la actividad enzimática

**Tabla 8.** Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000L inmovilizada en agarosa

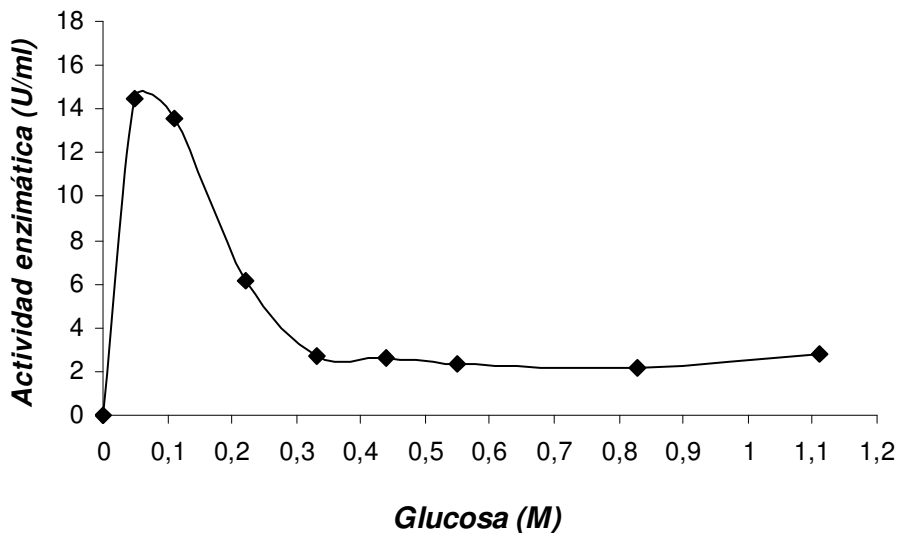
Glucosa (Molar)	Actividad U/ml		
	Enzima libre	Enzima en Alginato	Enzima Agarosa
0,0	0	0	0
0,05	4,95	14,50	5,19
0,11	5,86	13,58	5,23
0,22	6,57	6,15	3,26
0,33	6,87	2,76	4,36
0,44	7,47	2,67	7,67
0,55	7,37	2,38	6,62
0,83	6,67	2,16	4,78
1,11	6,87	2,85	3,68



**Gráfico 7:** Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L libre bajo los parámetros de temperatura a 55°C y pH 5  $n = 3$   $\delta=0.06$



**Gráfico 8:** Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L inmovilizada en agarosa bajo los parámetros de temperatura 55°C y pH 8,  $n = 2$ ,  $\delta = 0.06$



**Gráfico 9:** Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática en la enzima comercial Glucosa oxidasa GOX Maxazyme 4000 L inmovilizada en alginato de Sodio bajo los parámetros de temperatura 50°C y pH 6  $n = 2$ ,  $\delta = 0.04$

En la grafica No. 7 nos muestra que a concentraciones de 0,05, 0,11, 0,22 y 0,33 Molar

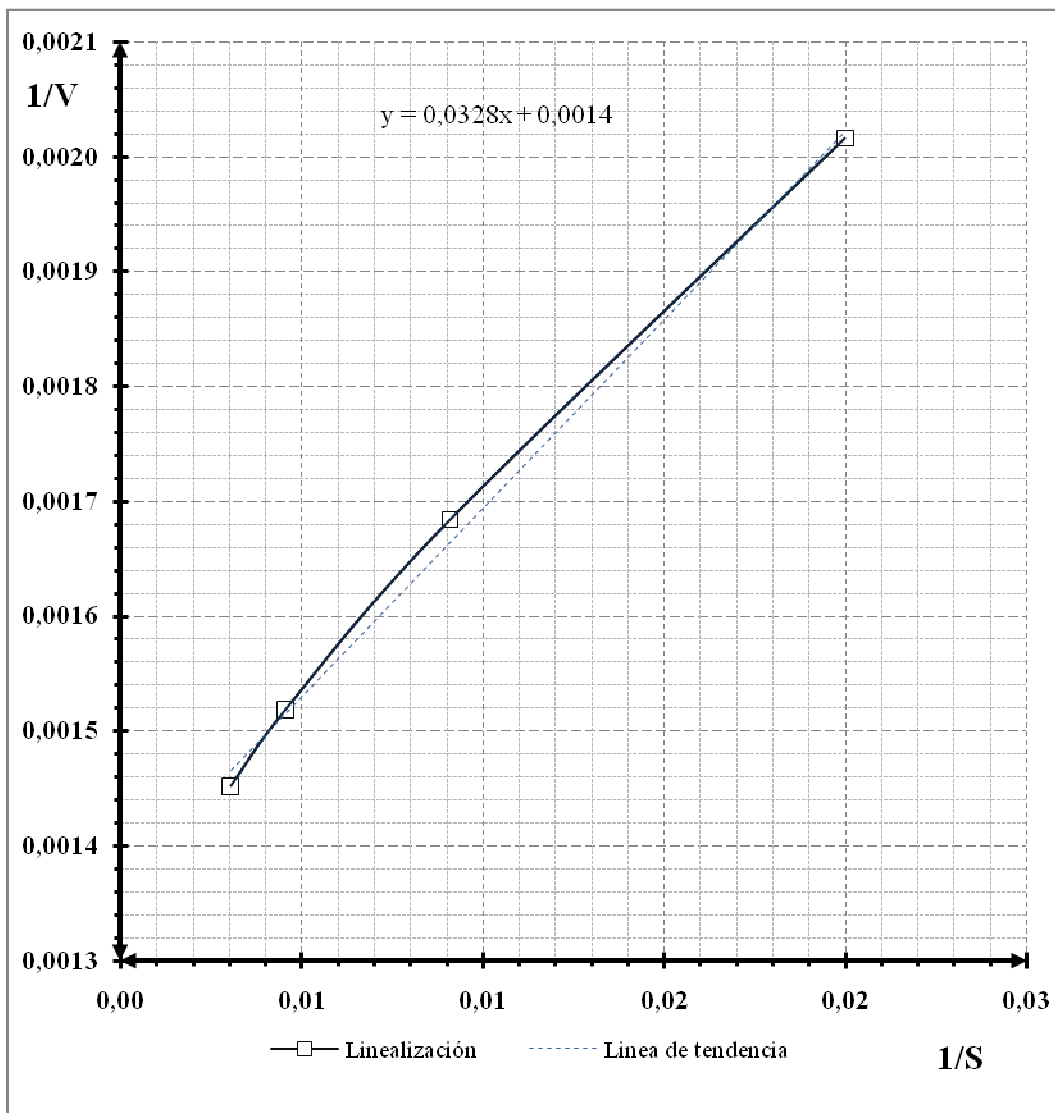
registra un aumento de actividad enzimática de forma constante y obteniendo una actividad del 100 % en 0,44 Molar.

La influencia de la concentración del sustrato sobre la actividad en la enzima inmovilizada en agarosa (Figura 8) presenta su mayor actividad en una concentración de 0,44 Molar, También se observó que las concentraciones 0,22 y 1,11 Molar fueron una de las mínimas actividades que presentó la enzima; es aquí donde se puede hacer una comparación de la teoría con la práctica ya que de acuerdo a la cantidad de sustrato si es muy baja o alta la velocidad de reacción enzimática disminuye.

### 3.5 CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA GLUCOSA OXIDASA (Gox) LIBRE

**Tabla 9:** Relación entre la concentración de sustrato y la actividad enzimática

Sustrato (mM)	Actividad U	1/S	1/U
0	0		
50	495,9	0,0200	0,0020
110	593,8	0,0091	0,0017
220	658,5	0,0045	0,0015
330	688,8	0,0030	0,0015
440	755,4	0,0023	0,0013
550	740,3	0,0018	0,0014
830	667,6	0,0012	0,0015



**Grafico 10:** Linealización de la relación entre sustrato y actividad enzimática utilizando la ecuación de Lineweaver Burk.

### 3.5.1 Linealización $K_m$ y $V_m$

$$1/V = k / V_{\max} * 1 / [S] + 1 / V_{\max}$$

De acuerdo a la gráfica la pendiente dio:  $1/V = 0,032 (1/S) + 0,0014$

$$V_{\max} = 1 / C$$

$$V_{\max} = 1 / 0,0014 = 714,2 \text{ U}$$

$$K_m = 0,032 * V_{\max}$$

$$K_m = 0,032 * 714,2 = 22,8 \text{ mM}$$

### 3.6 CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA GLUCOSA OXIDASA (Gox) INMOVILIZADA EN ALGINATO DE SODIO

**Tabla 10.** Valores de actividad y sustrato de la enzima (Gox) inmovilizada en alginato de sodio.

[S]	1/[S]	Pendiente	V	1/V
0,0	0,00	0,0	0,0	0,0
0,05	20,0	0,1436	1450,4	0,0007
0,11	9,09	0,1345	1358,5	0,0007
0,22	4,55	0,0609	615,1	0,0016
0,33	3,03	0,0273	275,7	0,0036
0,44	2,27	0,0264	266,6	0,0038
0,55	1,82	0,0236	238,4	0,0042
0,83	1,20	0,0214	216,1	0,0046
1,11	0,90	0,0282	284,8	0,0035

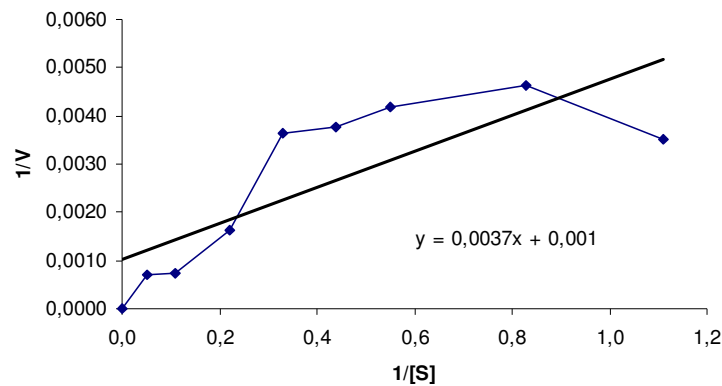


Gráfico 11: Cinética Enzimática

#### 3.6.1 Linealización Km y Vm

$$1/V = k / V \max * 1 / [S] + 1 / V \max$$

De acuerdo a la gráfica la pendiente dio:  $Y = 0.0037x + 0,001$

$$V \max = 1 / C$$

$$V \max = 1 / 0,001 = 1.000$$

$$K_m = 0,0037 * V \max$$

$$K_m = 0,0037 * 1.000 = 3,7$$

### 3.7 CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA GLUCOSA OXIDASA (Gox) INMOVILIZADA EN AGAROSA

**Tabla 11.** Valores de actividad y sustrato de la enzima (Gox) inmovilizada en agarosa.

[S]	1/[S]	Pendiente	V	1/V
0,0	0,00	0	0	0
0,05	20,00	0,0514	519,14	0,0019
0,11	9,09	0,0518	523,18	0,0019
0,22	4,55	0,0323	326,23	0,0031
0,33	3,03	0,0432	436,32	0,0023
0,44	2,27	0,0759	766,59	0,0013
0,55	1,82	0,0655	661,55	0,0015
0,83	1,20	0,0473	477,73	0,0021
1,11	0,90	0,0364	367,64	0,0027

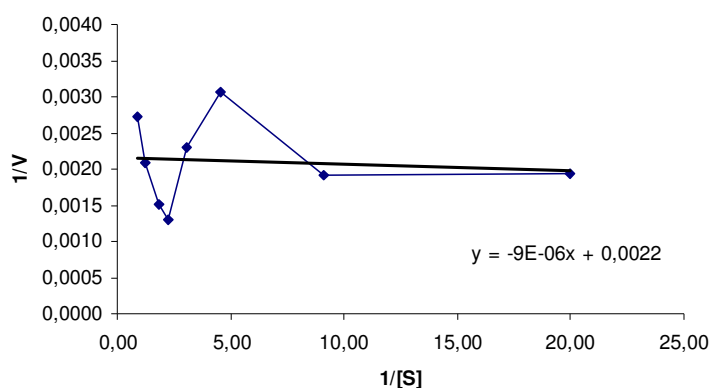


Grafico 12: Cinética Enzimática

#### 3.7.1 Linealización Km y Vm

$$1/V = k / V \text{ max} * 1 / [S] + 1 / V \text{ max}$$

De acuerdo a la gráfica la pendiente dio:  $Y = 0.0007 x + 0.0013$

$$V \text{ max} = 1 / C$$

$$V \text{ max} = 1 / 0.0013 = 769.23 \text{ U}$$

$$K_m = 0.0007 * V \text{ max}$$

$$K_m = 0.0007 * 769.23 = 0.538 \text{ mM}$$

#### **4. DISEÑO EXPERIMENTAL**

La caracterización de la enzima Glucosa Oxidasa (GOx) libre e inmovilizada en los dos soportes, se desarrollo en cada ensayo de forma independiente, realizando por duplicado cada experimento, sin que las variables en estudio se relacionen entre si, implicando que entre ellas no exista influencia alguna.

## CONCLUSIONES

- Se determina la cantidad de enzima Glucosa Oxidasa necesaria para producir una disminución de 0.1 unidades de actividad de pH por minuto, a una temperatura de 55°C, pH inicial de 5 y una concentración de glucosa como sustrato del 1% P/V.
- Los resultados obtenidos en esta caracterización se muestran a continuación:

**Tabla 12. Resultados de la inmovilización de la enzima Glucosa oxidasa**

Parámetro óptimo	Característica de la enzima		
	Libre	Inmovilizada	
		Alginato	Agarosa
Temperatura (°C)	55	50	55
pH	5	9	10
Conc. de sustrato (mM)	220	400	440
Vmax	714.2	Dn	Dn
Km (mM)	22.8	Dn	Dn
Actividad (U)	5.1	10.8	18.6
Agarosa (%)	--	--	3
Alginato (%)	--	2	--
CaCl <sub>2</sub> (%)	--	1.5	--

Dn: datos no concluyentes.

Lo cual implica que la inmovilización en agarosa y alginato presentan diferencias en las condiciones de actividad de la enzima libre.

- Aunque no se realizó el análisis respectivo para saber la cantidad de ácido glucónico se produjo y en qué grado de pureza se encuentra; se pudo establecer que efectivamente si hay producción del ácido y queda para futuros trabajos analizar lo que se deja como base de datos en este trabajo como punto de partida para futuras investigaciones.

## **RECOMENDACIONES**

- Hacer estudios de laboratorio con miras a la obtención de información que nos permitan un escalamiento a planta piloto.
- Con base en esto, se pueden establecer parámetros económicos para determinar la viabilidad del proceso.

## GLOSARIO

### **Alginato:**

Un polisacárido que se obtiene de los feófitos, se usa y comercializa del mismo modo que el agar o el carrangin. Las algas pardas son también fuente de vitaminas y minerales y se utilizan como fertilizantes. Algunas especies (como el kobu) constituyen un aporte alimenticio importante, especialmente en la comida japonesa.

### **Enzima:**

Cualquiera de las numerosas sustancias orgánicas especializadas compuestas por polímeros de aminoácidos, que actúan como catalizadores en el metabolismo de los seres vivos.

### **Catalizador:**

Sustancia que altera la velocidad de una reacción química sin sufrir en sí ningún cambio químico. Las enzimas, que se encuentran entre los catalizadores más importantes, tienen una función esencial en los organismos vivos donde aceleran reacciones que de otra forma requerirían temperaturas que podrían destruir la mayoría de la materia orgánica.

### **Velocidad de reacción:**

Cantidad de sustancia que se transforma en una reacción química en la unidad de tiempo. Las reacciones químicas tienen lugar a muy distintas velocidades

### **Sustrato:**

Sustancia sobre la que actúa una enzima.

### **Reacción química:**

Proceso en el que una o más sustancias —los reactivos— se transforman en otras sustancias diferentes los productos de la reacción.

**Inmovilización de enzimas:**

Es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente.

**Índice de intercambio:**

Método absoluto de expresar actividades enzimáticas.

**Holoenzima:**

Es una enzima que está formada por una proteína (apoenzima) y un cofactor.

**Apoenzima:**

Parte proteica de una enzima que juntamente con la coenzima forma una enzima completa.

**Cofactor:**

Es un ion metálico, termoestable y de baja masa molecular necesario para la acción de una enzima. El cofactor se une a la estructura proteica denominada apoenzima y a este complejo se le denomina holoenzima.

**Enzima Alostérica:**

Aquella cuya actividad es regulada por la unión no covalente de un metabolito específico a un centro de la enzima distinta del sitio activo.

**FAD:**

Flavin adenin dinucleotido se encuentra como grupo prostético en las flavo proteínas que pueden hacer la transferencia secuencial de un electrón o bien simultánea de 2 electrones la cual rodea el estado de semiquinona.

**NAD:**











Nicotinamida adenin dinucleotido es una coenzima de la vitamina B3 cuya función principal es el intercambio de hidrogeniones en la producción de energía de todas las

células. Forma el primer complejo en la captación de hidrógenos en la fosforilación oxidativa aparece en múltiples reacciones del metabolismo.

## BIBLIOGRAFIA












- Angenaurt Jacques. Diccionario enciclopédico de química. Editorial Compañía Continental S.A. México 1998.
- Bohinski Robert y Carroll John. University. Bioquímica. Fondo Educativo Interamericano S.A.Mexico 1978.
- Bollag, D., Rozycki, M., Edelstein, S., En: Protein Methods, 2 da edición, Wiley- Liss Inc, (1996).
- Bozal Fes Jorge. Enzimología. Trabajos dirigidos. Ediciones Omega S.A. Barcelona 1976. Pág. 169 – 172.
- Cárdenas Eduardo. Enzimas alostéricas: cooperatividad en la unión y en catálisis. Ediciones H. Blume. Madrid 1978. Pág. 71 – 84.
- Chibata, I.; Tosa, T. (1980) Immobilized microbial cells and their applications. *Trends Biochem. Sci.* **5**:88-90.
- Dixon, M., Webb, E. C., En: Enzymes 3 era Ed.; Dixon, M., Webb, . C., (Eds), Academic Press, New York, (1979).
- Enzimas-campos de aplicación. En: Folleto Técnico de Novo-Nordisk a/s (1989). Dinamarca.
- FC. Webb.Ingeniería Bioquímica. Editorial Acribia. Zaragoza España. 1966.
- Gacesa Peter y Hube John. Tecnología de las enzimas. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España.1990. Pág 101.

- García Garibay y Quintero Ramírez López Munquía. *Biotecnología Alimentaria*. Editorial Limusa. México. 2000
  
- Germain, P.; Crichton, R. (1988) Characterization of a chemically modified  $\alpha$ -amilase immobilized on porous silica. *J.Chem. Technol. Biotechnol.* **41**: 297-315.
  
- Hartmeier, W., En: *Immobilized biocatalysts*; Springer-Verlag, Berlin, (1988).
  
- Honda, Y.; Kako, M.; Abiko, K.; Sogo, Y. (1993) *Industrial Application of immobilized enzymes*, Tanaka, A. et al. eds. Marcel Dekker, pág. 209-234.
  
- <http://www.biochemistry.org/education/basc03.htm>
  
- Illanes, A., En: *Biotecnología de Enzimas*, Monografía N° 35 de la OEA, Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, (1994).
  
- J. y Leveau y M. Bouix. *Microbiología industrial*. Editorial Acribia. España 2000.
  
- Jakoby, W., En: *Enzyme purification and related techniques*. *Methods in Enzymology* Vol XX Secc VIII: Large Scale Methods, Academic Press, New York, (1981).
  
- Joshi A.P y Kulkarni B.D. Continuous Production of gluconic acid by aspergillus Niger immobilized on a cellulosic support: study of low pH fermentative behavior of Aspergillus Niger. *Process biochemistry* 1999.
  
- Kawase y Znad H. Modeling and simulation of airlift bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*. 2004.


-  Kirk, Raymond, Enciclopedia de Tecnología Química, Tomo VI, primera Edición, Editorial Uteha, España 1962.
  
-  Klei, H.E.; Sundstrom, D.W.; Shim, D. (1985) Immobilization of enzymes by microencapsulation en *Immobilized cells and enzymes: a practical approach* J. Woodward, ed. IRL Press, pág. 49-54.
  
-  Laguna, José Bioquímica, 2ª ed., Facultad de Medicina, UNAM, México D.F., Fournier S.A., 1969.
  
-  Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental de Uruguay, (1997).
  
-  Losa Gutiérrez Celso. Ingeniería Bioquímica. Editorial Acribia . Zaragoza España. 1962. Pág. 652.
  
-  Magee, E.L.; Olson, N.F.; Linslay, R.C. (1981) Microencapsulation of cheese ripening systems: production of diacetyl and acetoin in cheese by encapsulated bacterial cell free extract. *J. Dairy Sci.* **64**: 616-621.
  
-  Mathews, C., y Van Holde, K., En: Bioquímica 2 da Ed., McGraw-Hill, Interamericana, Madrid, (1998).
  
-  May Orville, Thom Charles y otros. The production of gluconic acid by the penicillium luteum – purpurage num group. 1927.
  
-  Mellor, R.B.; Ronnenberg, J.; Campbell, W.M.; Diekmann, S. (1992) Reduction of nitrate and nitrite in water by immobilized enzymes. *Nature* **355**: 717-719.
  
-  Messing, R., En: Immobilized enzymes for industrial reactors; Academic Press,

Inc, London, (1975).

- Nagasawa, T.; Yamada, H. (1989) Microbial transformations of nitriles. *Trends Biotechnol.* **7**: 153-158.
  
- Nakao Katsumi y Kiefner Andreas. Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors. Editorial Pergamon 1977.
  
- Océano, Enciclopedia de la Ciencia y La tecnología Tomo V, ediciones Océano, Barcelona 1980.
  
- P Gasesa y J. Hubble, tecnología de las enzimas, Editorial Acribis. S.A., Segunda Edición, Zaragoza España, 1990.
  
- Pérez Gerardo y Navarro Yolanda. Bioquímica. Unisur 1991. Pág. 398.
  
- Perry, Manual del Ingeniero Químico, sexta Edición, Tomo VI, Editorial McGraw-Hill, 1992.
  
- Piffer, P.G.; Spagna, G.; Bustetto, L. (1987) Immobilization of endopolygalacturonase on  $\gamma$ -alumina for the treatment of fruit juices. *J. Mol. Catal.* **42**: 137-149.
  
- Posorke, L.H.; Lefebvre, G.K.; Miller, C.A.; Hansen, T.T.; Glenvig, B.L. (1988) Process considerations of continuous fat modification with an immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**: 922-926.

-  Purves, W., Orians, G., Craig, H., y Sadava, D., En: Life: the science of biology, W. H. Freeman & Company, (Eds), (1998).
  
-  Retama Jorge Rubio y Ruiz Beatriz. Optimización de la inmovilización de glucosa oxidasa en microgeles de poliacrilamida. Departamento de Química Analítica. Universidad Complutense de Madrid. Artículo original. Madrid 2003.
  
-  Rodwel. et alli Bioquímica de Harper, 13ª ed., s.d.
  
-  Sáez Regio Julián y Martínez Susana. Diccionario de Química. Traducido por immaculada. Oxford University press. Editorial Complutense S.A.1997.
  
-  Samuel Cate Prescott and Cecil Gordon Dunn. Industrial Microbiology. Mc Graw Hill. 1959.
  
-  Scragg Alan. Biotecnología para Ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Departamento de biología molecular y biotecnología. Editorial Limusa. Grupo Noriega Editores.México 2002.
  
-  Stryer, L., En: Bioquímica 4 ta Ed.; Editorial Reverté, Barcelona, (1995).
  
-  T. K Ghose, A. Fietcher y N. Blakebrough. Advances in Biochemical engineering. Springer – Verlag. Berlin Heidelberg. New York 1978. Pág 93- 94.
  
-  Teal, A. R., y Wymer, P., En: Enzymes and their role in biotechnology.
  
-  Wingard, L.B. (1972) Enzyme Engineering, Interscience Publishers, New York.
  
-  Wiseman Alan. Manual de biotecnología de las enzimas. Editorial Acribia. Zaragoza España S.A. 1991. Pág. 65 – 77.

- 📖 Wulf Crueger. Biotecnología. Manual de microbiología industrial. Editorial Acribia. Zaragoza España. 1989.
- 📖 [www.bioenlaces.com/alimentos](http://www.bioenlaces.com/alimentos)
- 📖 [www.capitulo8/limpieza.htm](http://www.capitulo8/limpieza.htm)
- 📖 [www.cnb.uam.es](http://www.cnb.uam.es)
- 📖 [www.drcalderonlabs.com](http://www.drcalderonlabs.com)
- 📖 [www.elsevier.com/locate/bej](http://www.elsevier.com/locate/bej)
- 📖 [www.elsevier.com/locate/proebio](http://www.elsevier.com/locate/proebio)
- 📖 [www.expasy.org/enzyme](http://www.expasy.org/enzyme)
- 📖 [www.geocities.com](http://www.geocities.com)
- 📖 [www.kimica.jp/spanish/pag10.htm](http://www.kimica.jp/spanish/pag10.htm)
- 📖 [www.monografias.com/la\\_enzimologia](http://www.monografias.com/la_enzimologia)
- 📖 [www.monografias.com/tecnologia\\_enzimatica](http://www.monografias.com/tecnologia_enzimatica)
- 📖 [www.monografias.com/trabajos12/alginateo/alginateos.html](http://www.monografias.com/trabajos12/alginateo/alginateos.html)
- 📖 [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)
- 📖 [www.porquebiotecnologia.com.ar](http://www.porquebiotecnologia.com.ar)
- 📖 [www.salud.gov.mx/unidades/cdi/documentos/capitulo8.html](http://www.salud.gov.mx/unidades/cdi/documentos/capitulo8.html)

 [www.swissprot.com](http://www.swissprot.com)

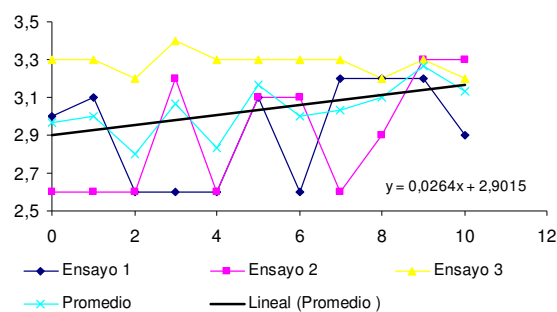
## ANEXOS

### ANEXOS A. ENSAYOS EN LABORATORIO

#### ENSAYOS EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LA ENZIMACOMERCIAL GLUCOSA OXIDASA GOX MAXAZYME L 4000 LIBRE BAJO LOS PARÁMETROS DE TEMPERATURA A 55°C Y CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO 0.11M

**Tabla No. 1: Ensayos a pH 2**

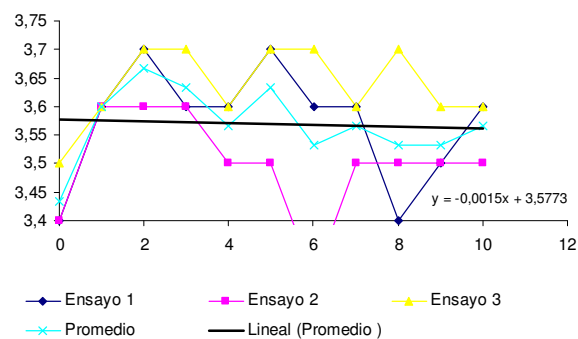
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	3,0	2,6	3,3	2,97
1	3,1	2,6	3,3	3,00
2	2,6	2,6	3,2	2,80
3	2,6	3,2	3,4	3,07
4	2,6	2,6	3,3	2,83
5	3,1	3,1	3,3	3,17
6	2,6	3,1	3,3	3,00
7	3,2	2,6	3,3	3,03
8	3,2	2,9	3,2	3,10
9	3,2	3,3	3,3	3,27
10	2,9	3,3	3,2	3,13



**Figura No.1: Ensayos a pH 2**

**Figura No.2: Ensayos a pH 3**

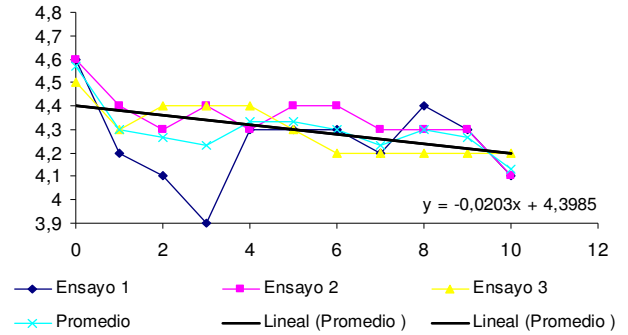
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	3,4	3,4	3,5	3,43
1	3,6	3,6	3,6	3,60
2	3,7	3,6	3,7	3,67
3	3,6	3,6	3,7	3,63
4	3,6	3,5	3,6	3,57
5	3,7	3,5	3,7	3,63
6	3,6	3,3	3,7	3,53
7	3,6	3,5	3,6	3,57
8	3,4	3,5	3,7	3,53
9	3,5	3,5	3,6	3,53
10	3,6	3,5	3,6	3,57



**Tabla No.2: Ensayos a pH 3**

**Tabla No.3: Ensayos a pH 4**

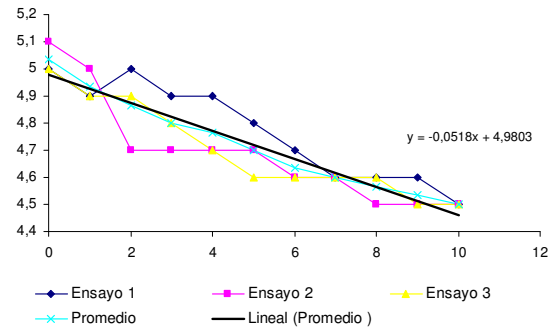
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	4,6	4,6	4,5	4,57
1	4,2	4,4	4,3	4,30
2	4,1	4,3	4,4	4,27
3	3,9	4,4	4,4	4,23
4	4,3	4,3	4,4	4,33
5	4,3	4,4	4,3	4,33
6	4,3	4,4	4,2	4,30
7	4,2	4,3	4,2	4,23
8	4,4	4,3	4,2	4,30
9	4,3	4,3	4,2	4,27
10	4,1	4,1	4,2	4,13



**Figura No.3: Ensayos a pH 4**

**Tabla No.4: Ensayos a pH 5**

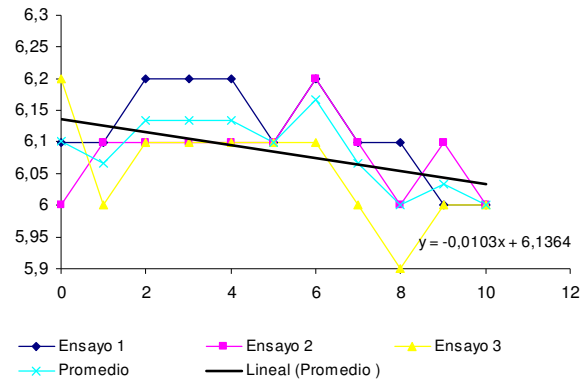
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	5	5,1	5	5,03
1	4,9	5	4,9	4,93
2	5	4,7	4,9	4,87
3	4,9	4,7	4,8	4,80
4	4,9	4,7	4,7	4,77
5	4,8	4,7	4,6	4,70
6	4,7	4,6	4,6	4,63
7	4,6	4,6	4,6	4,60
8	4,6	4,5	4,6	4,57
9	4,6	4,5	4,5	4,53
10	4,5	4,5	4,5	4,50



**Figura No.4: Ensayos a pH 5**

**Tabla No.5: Ensayos pH 6**

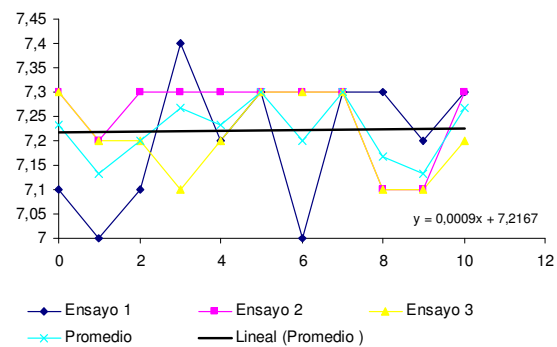
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	6,1	6	6,2	6,10
1	6,1	6,1	6	6,07
2	6,2	6,1	6,1	6,13
3	6,2	6,1	6,1	6,13
4	6,2	6,1	6,1	6,13
5	6,1	6,1	6,1	6,10
6	6,2	6,2	6,1	6,17
7	6,1	6,1	6	6,07
8	6,1	6	5,9	6,00
9	6	6,1	6	6,03
10	6	6	6	6,00



**Figura No.5: Ensayos a pH 6**

**Tabla No. 6: Ensayos a pH 7**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	7,1	7,3	7,3	7,23
1	7	7,2	7,2	7,13
2	7,1	7,3	7,2	7,20
3	7,4	7,3	7,1	7,27
4	7,2	7,3	7,2	7,23
5	7,3	7,3	7,3	7,30
6	7	7,3	7,3	7,20
7	7,3	7,3	7,3	7,30
8	7,3	7,1	7,1	7,17
9	7,2	7,1	7,1	7,13
10	7,3	7,3	7,2	7,27

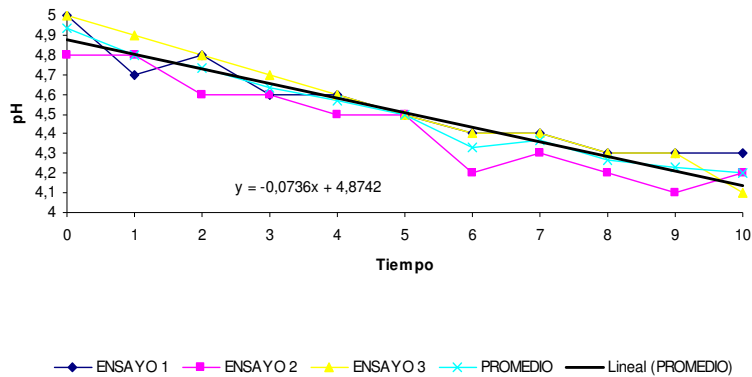


**Figura No. 6: Ensayos a pH 7**

**ENSAYOS EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA COMERCIAL GLUCOSA OXIDASA GOX MAXAZYME L 4000 LIBRE BAJO LOS PARAMETROS DE PH 5 Y UNA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO (GLUCOSA) DE 0.11 M**

**Tabla No.7: Ensayos a temperatura de 20°C**

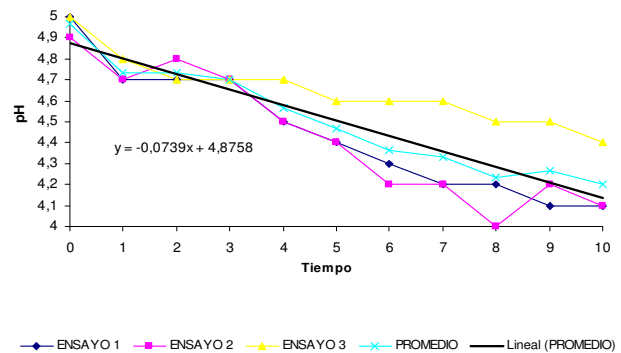
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	5	4,8	5	4,93
1	4,7	4,8	4,9	4,80
2	4,8	4,6	4,8	4,73
3	4,6	4,6	4,7	4,63
4	4,6	4,5	4,6	4,57
5	4,5	4,5	4,5	4,50
6	4,4	4,2	4,4	4,33
7	4,4	4,3	4,4	4,37
8	4,3	4,2	4,3	4,27
9	4,3	4,1	4,3	4,23
10	4,3	4,2	4,1	4,20



**Figura No.7: Ensayos a temperatura de 20°C**

**Tabla No.8: Ensayos a temperatura de 25**

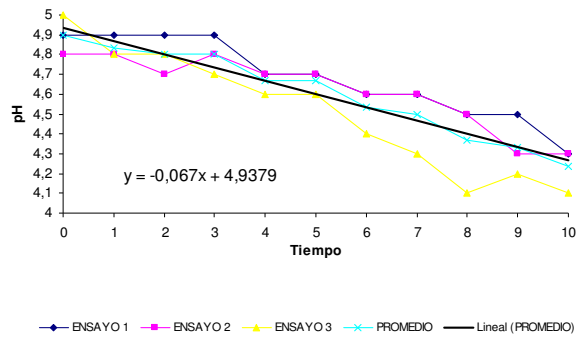
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	5	4,9	5	4,97
1	4,7	4,7	4,8	4,73
2	4,7	4,8	4,7	4,73
3	4,7	4,7	4,7	4,70
4	4,5	4,5	4,7	4,57
5	4,4	4,4	4,6	4,47
6	4,3	4,2	4,6	4,37
7	4,2	4,2	4,6	4,33
8	4,2	4	4,5	4,23
9	4,1	4,2	4,5	4,27
10	4,1	4,1	4,4	4,20



**Figura No.8: Ensayos a temperatura de 25°**

**Tabla No.9: Ensayos a temperatura de 30°C**

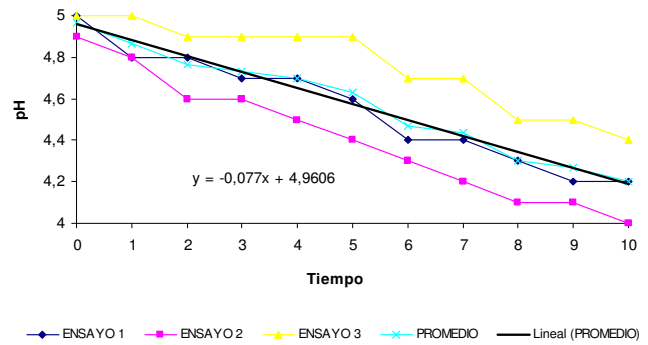
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	4,9	4,8	5	4,90
1	4,9	4,8	4,8	4,83
2	4,9	4,7	4,8	4,80
3	4,9	4,8	4,7	4,80
4	4,7	4,7	4,6	4,67
5	4,7	4,7	4,6	4,67
6	4,6	4,6	4,4	4,53
7	4,6	4,6	4,3	4,50
8	4,5	4,5	4,1	4,37
9	4,5	4,3	4,2	4,33
10	4,3	4,3	4,1	4,23



**Figura No.9: Ensayos a temperatura de 30°C**

**Tabla No.10: Ensayos a temperatura de 35°C**

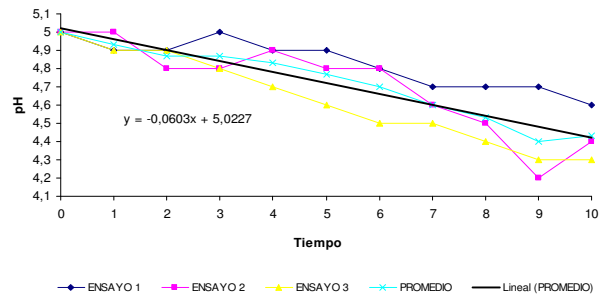
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	5	4,9	5	4,97
1	4,8	4,8	5	4,87
2	4,8	4,6	4,9	4,77
3	4,7	4,6	4,9	4,73
4	4,7	4,5	4,9	4,70
5	4,6	4,4	4,9	4,63
6	4,4	4,3	4,7	4,47
7	4,4	4,2	4,7	4,43
8	4,3	4,1	4,5	4,30
9	4,2	4,1	4,5	4,27
10	4,2	4	4,4	4,20



**Figura No.10: Ensayos a temperatura de 35°C**

**Tabla No.11: Ensayos a temperatura de 40°C**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	5	5	5	5,00
1	4,9	5	4,9	4,93
2	4,9	4,8	4,9	4,87
3	5	4,8	4,8	4,87
4	4,9	4,9	4,7	4,83
5	4,9	4,8	4,6	4,77
6	4,8	4,8	4,5	4,70
7	4,7	4,6	4,5	4,60
8	4,7	4,5	4,4	4,53
9	4,7	4,2	4,3	4,40
10	4,6	4,4	4,3	4,43



**Figura No.11: Ensayos a temperatura de 40°C**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	5	5	5	5,00
1	4,9	5	4,9	4,93
2	4,9	4,9	4,8	4,87
3	5	4,8	4,8	4,87
4	4,9	4,9	4,7	4,83
5	4,9	4,8	4,6	4,77
6	4,8	4,8	4,5	4,70
7	4,7	4,6	4,5	4,60
8	4,7	4,5	4,4	4,53
9	4,7	4,2	4,3	4,40
10	4,6	4,4	4,3	4,43

Tabla No.12: Ensayos a temperatura de 45°C

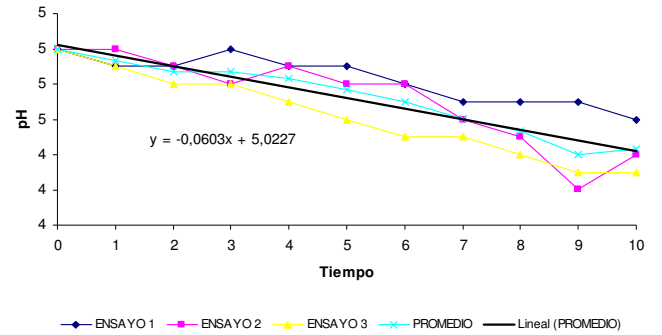


Figura No.12: Ensayos a temperatura de 45°C

Figura No.13: Ensayos a temperatura de 50°C

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	4,8	4,8	4,8	4,80
1	4,7	4,7	4,7	4,70
2	4,6	4,7	4,7	4,67
3	4,5	4,6	4,6	4,57
4	4,5	4,6	4,6	4,57
5	4,5	4,5	4,5	4,50
6	4,4	4,4	4,5	4,43
7	4,4	4,4	4,4	4,40
8	4,4	4,3	4,3	4,33
9	4,1	4,2	4,2	4,17
10	4	4,1	4,1	4,07

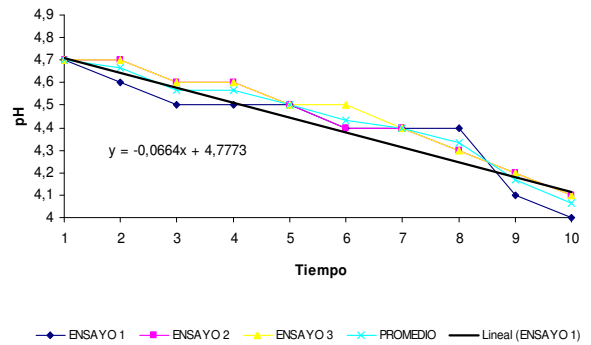


Tabla No.13: Ensayos a temperatura de 50°C

Tabla No.14: Ensayos a temperatura de 55°C

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	4,7	4,8	4,8	4,77
1	4,6	4,6	4,6	4,60
2	4,5	4,6	4,5	4,53
3	4,4	4,4	4,4	4,40
4	4,3	4,3	4,3	4,30
5	4,1	4,2	4,3	4,20
6	4,1	4,2	4,1	4,13
7	4	4,1	4,1	4,07
8	3,9	4	4	3,97
9	3,9	3,9	3,9	3,90
10	3,9	3,8	3,8	3,83

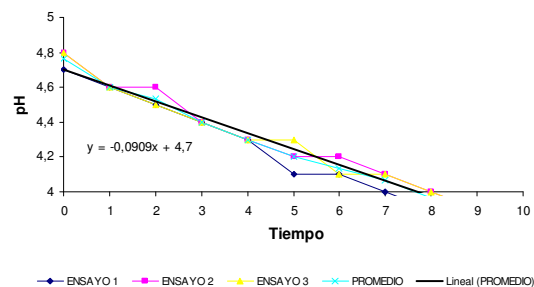
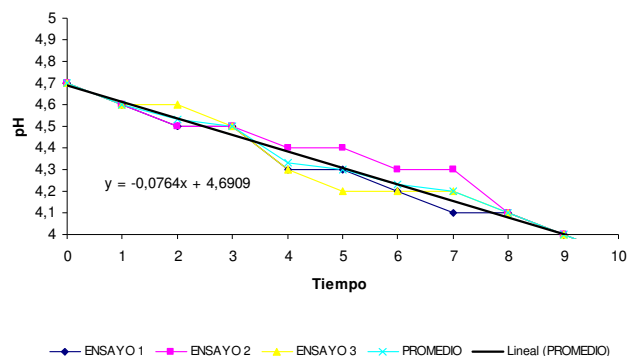


Figura No.14: Ensayos a temperatura de 55°C

**Tabla No.15: Ensayos a temperatura de 60°C**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	4,7	4,7	4,7	4,70
1	4,6	4,6	4,6	4,60
2	4,5	4,5	4,6	4,53
3	4,5	4,5	4,5	4,50
4	4,3	4,4	4,3	4,33
5	4,3	4,4	4,2	4,30
6	4,2	4,3	4,2	4,23
7	4,1	4,3	4,2	4,20
8	4,1	4,1	4,1	4,10
9	4	4	4	4,00
10	3,9	3,9	3,9	3,90



**Figura No.15: Ensayos a temperatura de 60°C**

**ENSAYOS EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA COMERCIAL GLUCOSA OXIDASA GOX MAXAZYME L 4000 LIBRE BAJO LOS PARÁMETROS DE pH 5 Y CONCENTRACIÓN Y TEMPERATURA A 55°C**

**Tabla No. 16: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,05**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	4,3	4,1	4,3	4,2
1	4,2	4,0	4,2	4,1
2	4,1	4,0	4,1	4,1
3	4,1	3,9	4	4,0
4	4,0	3,9	4	4,0
5	4,0	3,8	3,9	3,9
6	3,9	3,8	3,9	3,9
7	3,9	3,7	3,8	3,8
8	3,9	3,7	3,8	3,8
9	3,8	3,7	3,7	3,7
10	3,8	3,7	3,7	3,7

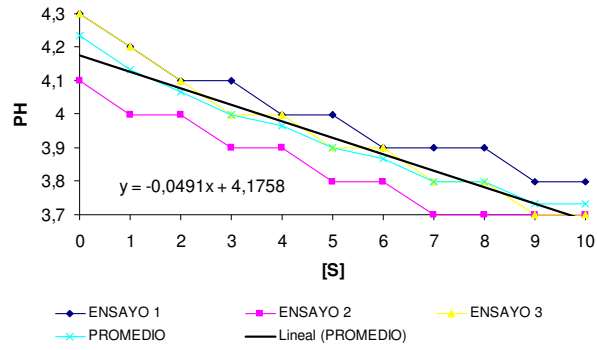


Figura No.16: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,05

Tabla No.17: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,11

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	4,4	4,3	4,3	4,3
1	4,2	4,2	4,2	4,2
2	4,1	4,1	4,1	4,1
3	4,0	4,0	4,1	4,0
4	4,0	3,9	4,0	4,0
5	3,9	3,8	4	3,9
6	3,8	3,8	3,9	3,8
7	3,8	3,7	3,9	3,8
8	3,8	3,7	3,8	3,8
9	3,7	3,7	3,8	3,7
10	3,7	3,7	3,8	3,7

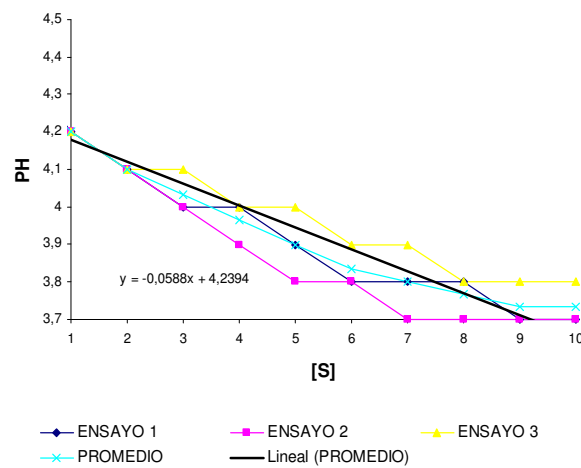
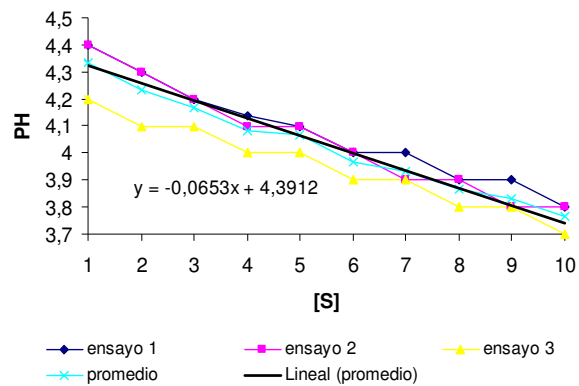


Figura No.17: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,11

**Tabla No.18: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,22**

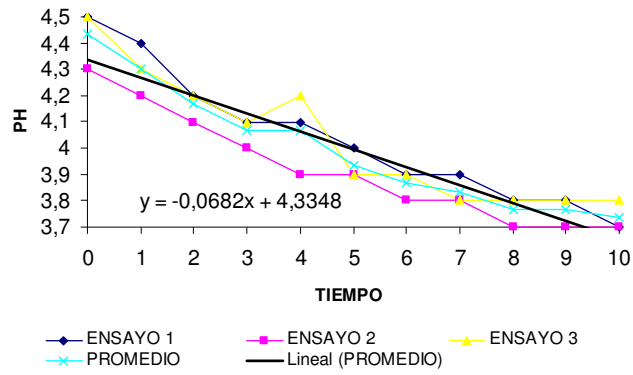
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	4,5	4,5	4,4	4,5
1	4,4	4,4	4,2	4,3
2	4,3	4,3	4,1	4,2
3	4,2	4,2	4,1	4,2
4	4,1	4,1	4,0	4,1
5	4,1	4,1	4	4,1
6	4	4	3,9	4,0
7	4	3,9	3,9	3,9
8	3,9	3,9	3,8	3,9
9	3,9	3,8	3,8	3,8
10	3,8	3,8	3,7	3,8



**Figura No.18: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,22**

**Tabla No.19: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,33**

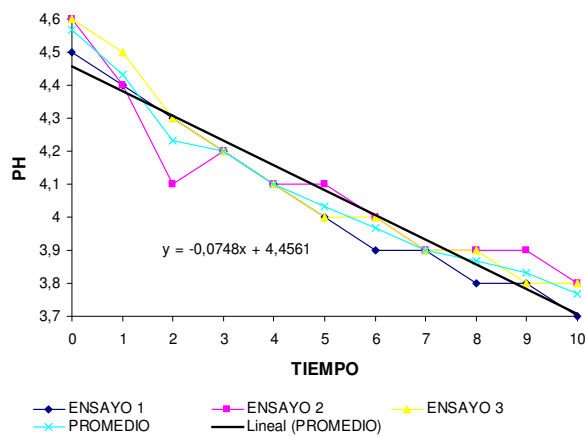
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	4,5	4,3	4,5	4,4
1	4,4	4,2	4,3	4,3
2	4,2	4,1	4,2	4,2
3	4,1	4,0	4,1	4,1
4	4,1	3,9	4,2	4,1
5	4,0	3,9	3,9	3,9
6	3,9	3,8	3,9	3,9
7	3,9	3,8	3,8	3,8
8	3,8	3,7	3,8	3,8
9	3,8	3,7	3,8	3,8
10	3,7	3,7	3,8	3,7



**Figura No.19: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,33**

**Tabla No.20: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,44**

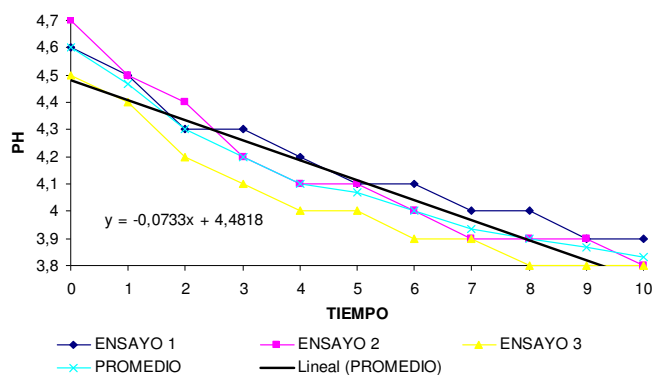
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	4,5	4,6	4,6	4,6
1	4,4	4,4	4,5	4,4
2	4,3	4,1	4,3	4,2
3	4,2	4,2	4,2	4,2
4	4,1	4,1	4,1	4,1
5	4,0	4,1	4	4,0
6	3,9	4,0	4	4,0
7	3,9	3,9	3,9	3,9
8	3,8	3,9	3,9	3,9
9	3,8	3,9	3,8	3,8
10	3,7	3,8	3,8	3,8



**Figura No. 20: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,44**

**Tabla No. 21: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,55**

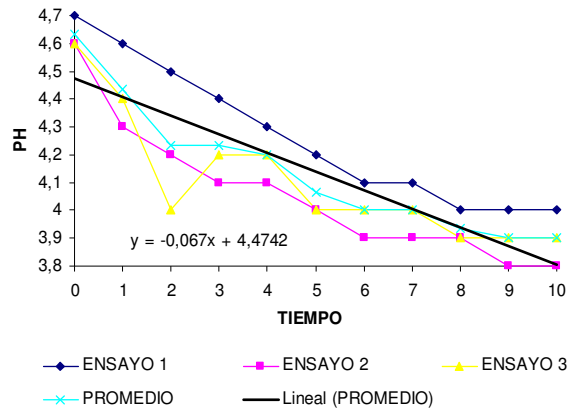
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	4,6	4,7	4,5	4,6
1	4,5	4,5	4,4	4,5
2	4,3	4,4	4,2	4,3
3	4,3	4,2	4,1	4,2
4	4,2	4,1	4,0	4,1
5	4,1	4,1	4	4,1
6	4,1	4,0	3,9	4,0
7	4	3,9	3,9	3,9
8	4	3,9	3,8	3,9
9	3,9	3,9	3,8	3,9
10	3,9	3,8	3,8	3,8



**Figura No. 21: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,55**

**Tabla No. 22: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,83**

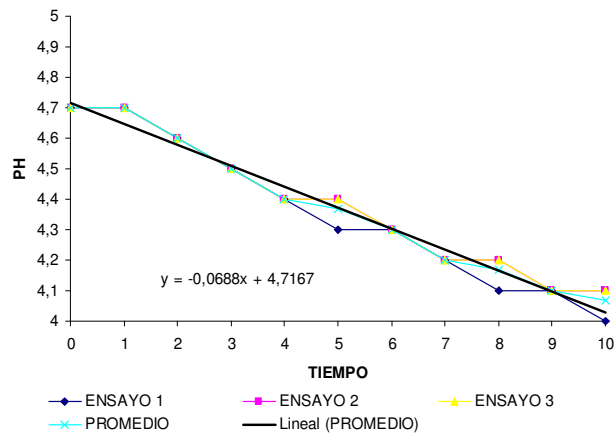
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	4,7	4,6	4,6	4,6
1	4,6	4,3	4,4	4,4
2	4,5	4,2	4	4,2
3	4,4	4,1	4,2	4,2
4	4,3	4,1	4,2	4,2
5	4,2	4	4	4,1
6	4,1	3,9	4	4,0
7	4,1	3,9	4	4,0
8	4	3,9	3,9	3,9
9	4	3,8	3,9	3,9
10	4	3,8	3,9	3,9



**Figura No. 22: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,83**

**Tabla No. 23: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 1,11**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
0	4,7	4,7	4,7	4,7
1	4,7	4,7	4,7	4,7
2	4,6	4,6	4,6	4,6
3	4,5	4,5	4,5	4,5
4	4,4	4,4	4,4	4,4
5	4,3	4,4	4,4	4,4
6	4,3	4,3	4,3	4,3
7	4,2	4,2	4,2	4,2
8	4,1	4,2	4,2	4,2
9	4,1	4,1	4,1	4,1
10	4	4,1	4,1	4,1

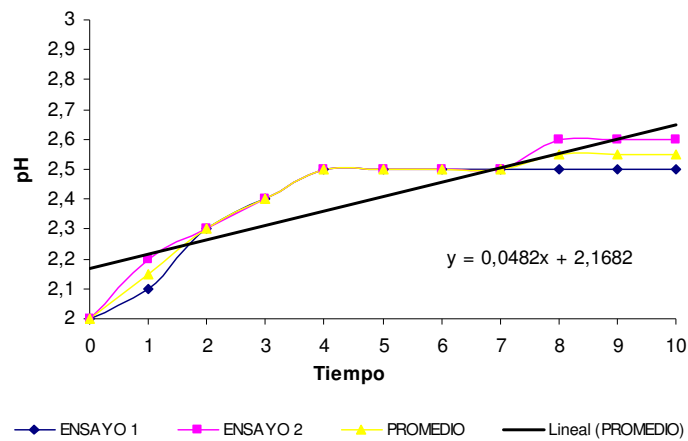


**Figura No. 23: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 1,11**

**EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA  
COMERCIAL GLUCOSA OXIDASA GOX MAXAZYME L 4000 INMOVILIZADA  
EN ALGINATO DE SODIO BAJO LOS PARÁMETROS TEMPERATURA 55°C Y  
CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO 0,44M**

**Tabla No. 24: Ensayos a pH 2**

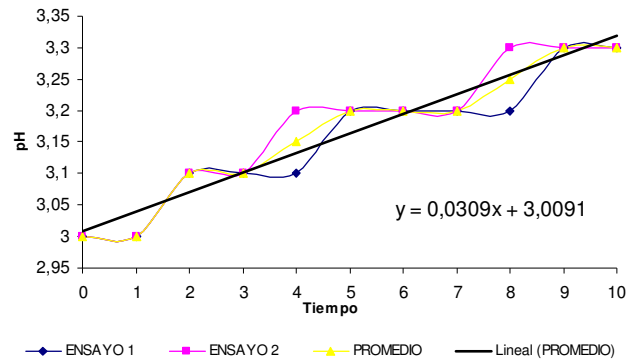
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	2	2	2,0
1	2,1	2,2	2,2
2	2,3	2,3	2,3
3	2,4	2,4	2,4
4	2,5	2,5	2,5
5	2,5	2,5	2,5
6	2,5	2,5	2,5
7	2,5	2,5	2,5
8	2,5	2,6	2,6
9	2,5	2,6	2,6
10	2,5	2,6	2,6



**Figura No. 24: Ensayos a pH 2**

**Tabla No. 25: Ensayos a pH 3**

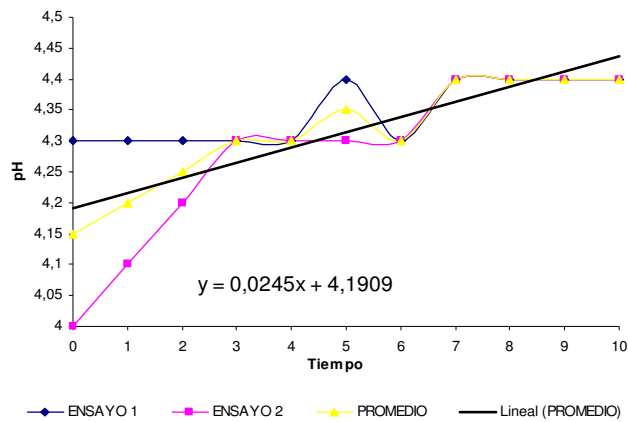
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	3	3	3,0
1	3	3	3,0
2	3,1	3,1	3,1
3	3,1	3,1	3,1
4	3,1	3,2	3,2
5	3,2	3,2	3,2
6	3,2	3,2	3,2
7	3,2	3,2	3,2
8	3,2	3,3	3,3
9	3,3	3,3	3,3
10	3,3	3,3	3,3



**Figura No. 25: Ensayos a pH 3**

**Tabla No. 26: Ensayos a pH 4**

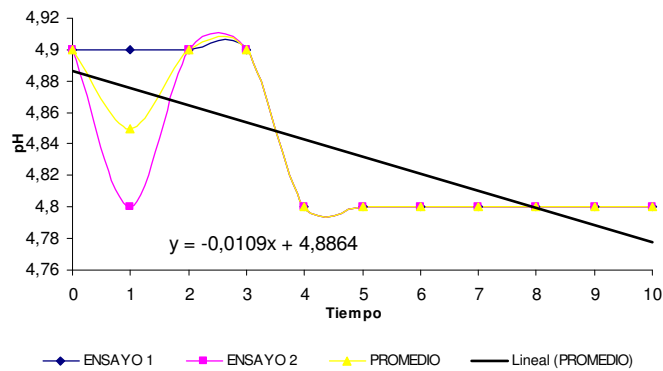
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	4,3	4	4,2
1	4,3	4,1	4,2
2	4,3	4,2	4,3
3	4,3	4,3	4,3
4	4,3	4,3	4,3
5	4,4	4,3	4,4
6	4,3	4,3	4,3
7	4,4	4,4	4,4
8	4,4	4,4	4,4
9	4,4	4,4	4,4
10	4,4	4,4	4,4



**Figura No. 26: Ensayos a pH 4**

**Tabla No. 27: Ensayos a pH 5**

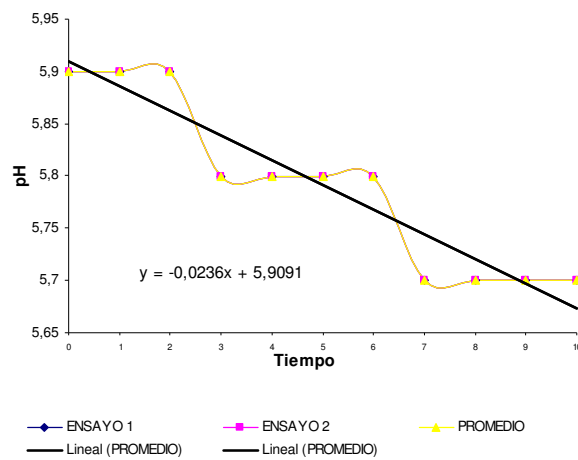
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	4,9	4,9	4,9
1	4,9	4,8	4,9
2	4,9	4,9	4,9
3	4,9	4,9	4,9
4	4,8	4,8	4,8
5	4,8	4,8	4,8
6	4,8	4,8	4,8
7	4,8	4,8	4,8
8	4,8	4,8	4,8
9	4,8	4,8	4,8
10	4,8	4,8	4,8



**Figura No. 27: Ensayos a pH 5**

**Tabla No. 28: Ensayos a pH 6**

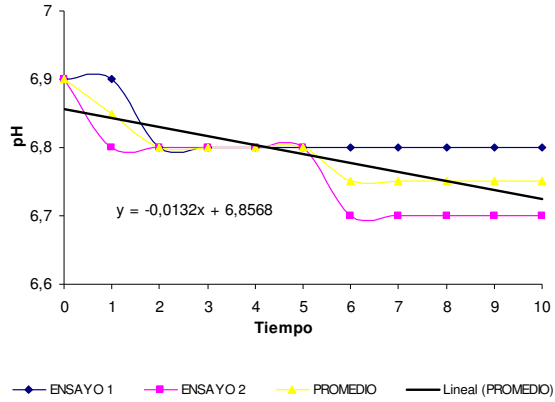
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,9	5,9	5,9
1	5,9	5,9	5,9
2	5,9	5,9	5,9
3	5,8	5,8	5,8
4	5,8	5,8	5,8
5	5,8	5,8	5,8
6	5,8	5,8	5,8
7	5,7	5,7	5,7
8	5,7	5,7	5,7
9	5,7	5,7	5,7
10	5,7	5,7	5,7



**Figura No. 28: Ensayos a pH 6**

**Tabla No. 29: Ensayos a pH 7**

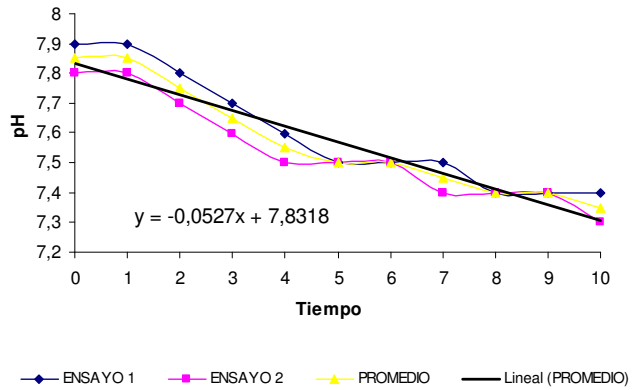
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	6,9	6,9	6,9
1	6,9	6,8	6,9
2	6,8	6,8	6,8
3	6,8	6,8	6,8
4	6,8	6,8	6,8
5	6,8	6,8	6,8
6	6,8	6,7	6,8
7	6,8	6,7	6,8
8	6,8	6,7	6,8
9	6,8	6,7	6,8
10	6,8	6,7	6,8



**Figura No. 29: Ensayos a pH 7**

**Tabla No. 29: Ensayos a pH 8**

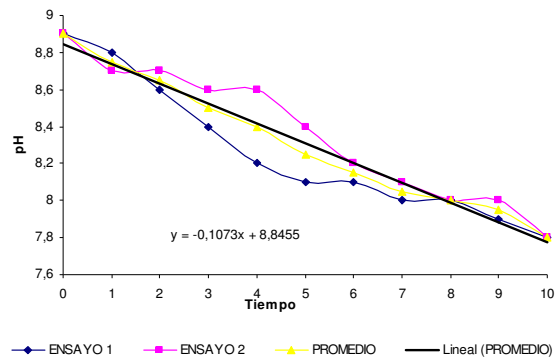
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	7,9	7,8	7,9
1	7,9	7,8	7,9
2	7,8	7,7	7,8
3	7,7	7,6	7,7
4	7,6	7,5	7,6
5	7,5	7,5	7,5
6	7,5	7,5	7,5
7	7,5	7,4	7,5
8	7,4	7,4	7,4
9	7,4	7,4	7,4
10	7,4	7,3	7,4



**Figura No. 29: Ensayos a pH 8**

**Tabla No. 30: Ensayos a pH 9**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	8,9	8,9	8,9
1	8,8	8,7	8,8
2	8,6	8,7	8,7
3	8,4	8,6	8,5
4	8,2	8,6	8,4
5	8,1	8,4	8,3
6	8,1	8,2	8,2
7	8	8,1	8,1
8	8	8	8,0
9	7,9	8	8,0
10	7,8	7,8	7,8

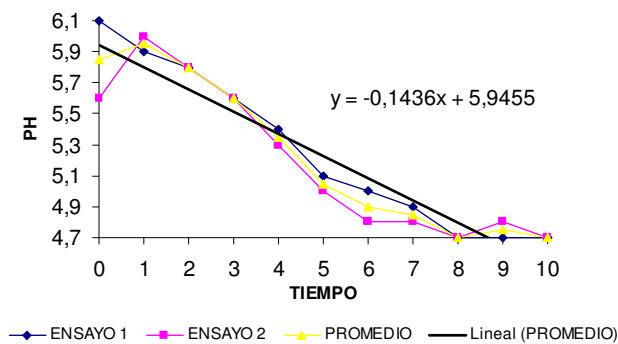


**Figura No. 30: Ensayos a pH 9**

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA COMERCIAL GLUCOSA OXIDASA GOX MAXAZYME L 4000 INMOVILIZADA EN ALGINATO DE SODIO BAJO LOS PARÁMETROS TEMPERATURA 50°C Y pH 6**

**Tabla No. 31: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,05**

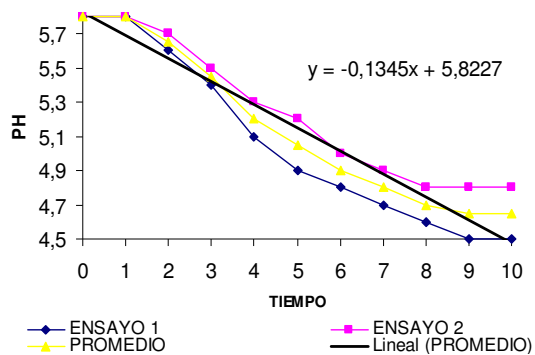
TIEMPO	ENSAYO 1	ENSAYO 2	PROMEDIO
0	6,1	5,6	5,9
1	5,9	6,0	6,0
2	5,8	5,8	5,8
3	5,6	5,6	5,6
4	5,4	5,3	5,4
5	5,1	5,0	5,1
6	5,0	4,8	4,9
7	4,9	4,8	4,9
8	4,7	4,7	4,7
9	4,7	4,8	4,8
10	4,7	4,7	4,7



**Figura No. 31: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,05**

**Tabla No. 32: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,11**

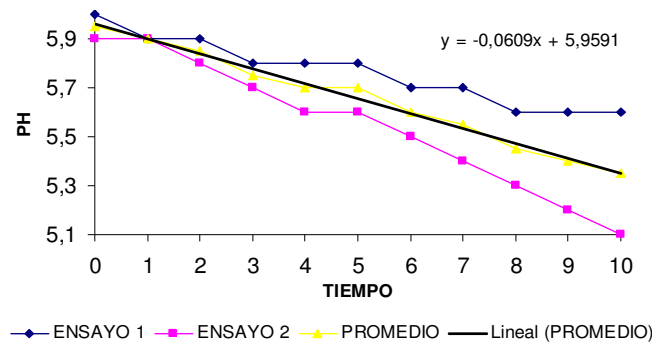
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,8	5,8	5,8
1	5,8	5,8	5,8
2	5,6	5,7	5,7
3	5,4	5,5	5,5
4	5,1	5,3	5,2
5	4,9	5,2	5,1
6	4,8	5	4,9
7	4,7	4,9	4,8
8	4,6	4,8	4,7
9	4,5	4,8	4,7
10	4,5	4,8	4,7



**Figura No. 32: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,11**

**Tabla No. 33: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,22**

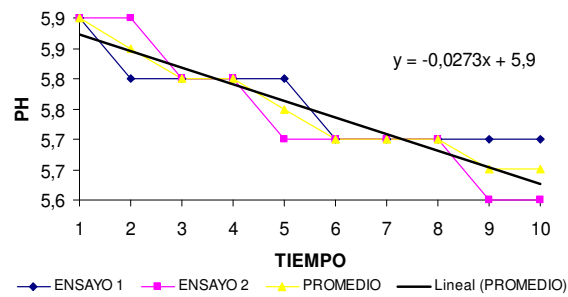
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	6,0	5,9	6,0
1	5,9	5,9	5,9
2	5,9	5,8	5,9
3	5,8	5,7	5,8
4	5,8	5,6	5,7
5	5,8	5,6	5,7
6	5,7	5,5	5,6
7	5,7	5,4	5,6
8	5,6	5,3	5,5
9	5,6	5,2	5,4
10	5,6	5,1	5,4



**Figura No. 33: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,22**

**Tabla No. 34: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,33**

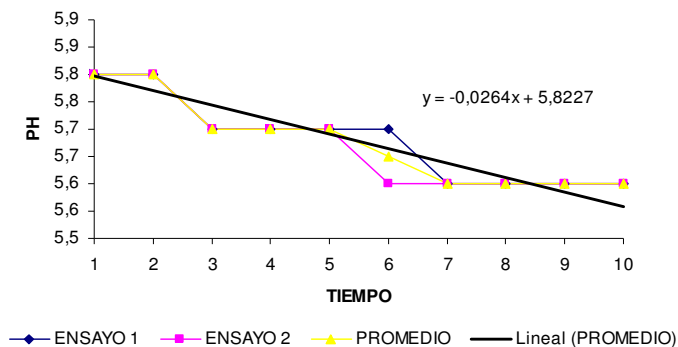
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,9	5,9	5,9
1	5,9	5,9	5,9
2	5,8	5,9	5,9
3	5,8	5,8	5,8
4	5,8	5,8	5,8
5	5,8	5,7	5,8
6	5,7	5,7	5,7
7	5,7	5,7	5,7
8	5,7	5,7	5,7
9	5,7	5,6	5,7
10	5,7	5,6	5,7



**Figura No. 34: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,33**

**Tabla No. 35: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,44**

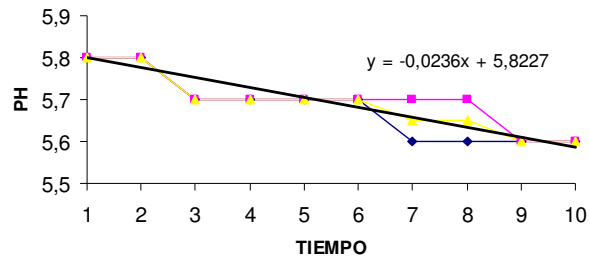
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,9	5,8	5,9
1	5,8	5,8	5,8
2	5,8	5,8	5,8
3	5,7	5,7	5,7
4	5,7	5,7	5,7
5	5,7	5,7	5,7
6	5,7	5,6	5,7
7	5,6	5,6	5,6
8	5,6	5,6	5,6
9	5,6	5,6	5,6
10	5,6	5,6	5,6



**Figura No. 35: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,44**

**Tabla No. 36: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,55**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,9	5,8	5,9
1	5,8	5,8	5,8
2	5,8	5,8	5,8
3	5,7	5,7	5,7
4	5,7	5,7	5,7
5	5,7	5,7	5,7
6	5,7	5,7	5,7
7	5,6	5,7	5,7
8	5,6	5,7	5,7
9	5,6	5,6	5,6
10	5,6	5,6	5,6

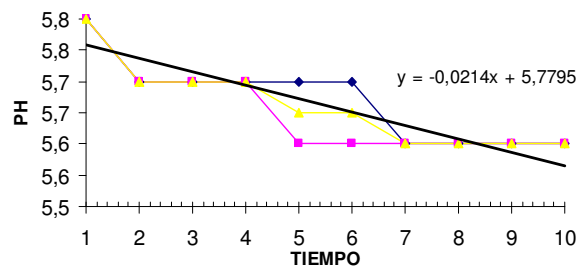


—◆— ENSAYO 1    —■— ENSAYO 2    —▲— PROMEDIO    — Lineal (PROMEDIO)

**Figura No. 36: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,55**

**Tabla No. 37: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,83**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,8	5,8	5,8
1	5,8	5,8	5,8
2	5,7	5,7	5,7
3	5,7	5,7	5,7
4	5,7	5,7	5,7
5	5,7	5,6	5,7
6	5,7	5,6	5,7
7	5,6	5,6	5,6
8	5,6	5,6	5,6
9	5,6	5,6	5,6
10	5,6	5,6	5,6

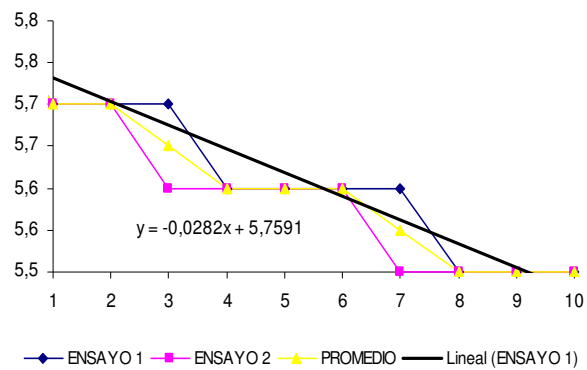


—◆— ENSAYO 1    —■— ENSAYO 2    —▲— PROMEDIO    — Lineal (PROMEDIO)

**Figura No. 37: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,83**

**Tabla No. 38: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 1,11**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,8	5,8	5,8
1	5,7	5,7	5,7
2	5,7	5,7	5,7
3	5,7	5,6	5,7
4	5,6	5,6	5,6
5	5,6	5,6	5,6
6	5,6	5,6	5,6
7	5,6	5,5	5,6
8	5,5	5,5	5,5
9	5,5	5,5	5,5
10	5,5	5,5	5,5

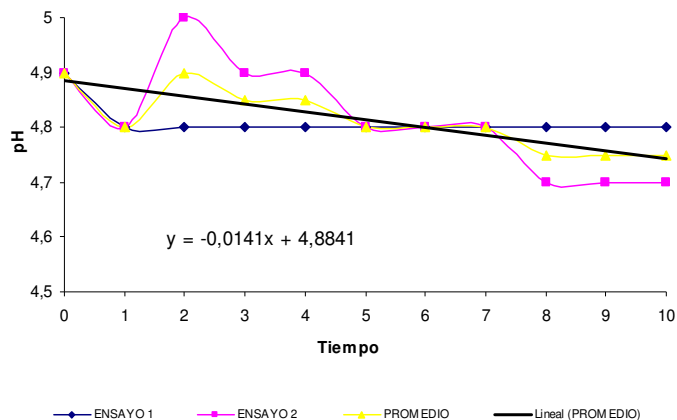


**Figura No. 38: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 1,11**

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA COMERCIAL GLUCOSA OXIDASA GOX MAXAZYME L 4000 INMOVILIZADA EN ALGINATO DE SODIO BAJO LOS PARÁMETROS CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO 0.44M Y pH 6**

**Tabla No. 39: Ensayos a temperatura de 30°C**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	4,9	4,9	4,9
1	4,8	4,8	4,8
2	4,8	5	4,9
3	4,8	4,9	4,9
4	4,8	4,9	4,9
5	4,8	4,8	4,8
6	4,8	4,8	4,8
7	4,8	4,8	4,8
8	4,8	4,7	4,8
9	4,8	4,7	4,8
10	4,8	4,7	4,8



**Figura No. 39: Ensayos a temperatura de 30°C**

Tabla No. 40: Ensayos a temperatura de 40°C

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,1	5,1	5,1
1	5	5	5,0
2	5	4,9	5,0
3	4,9	4,8	4,9
4	4,9	4,8	4,9
5	4,9	4,7	4,8
6	4,8	4,8	4,8
7	4,8	4,7	4,8
8	4,8	4,7	4,8
9	4,8	4,7	4,8
10	4,8	4,7	4,8

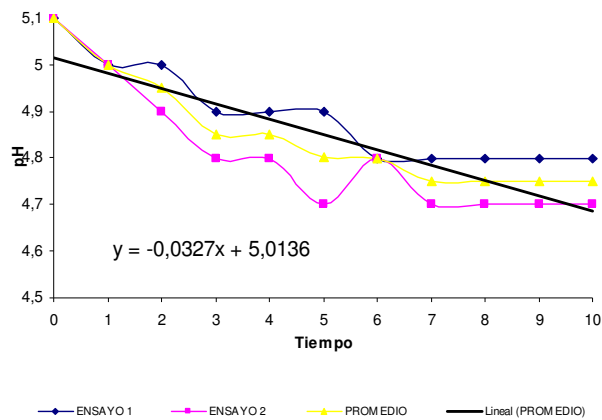
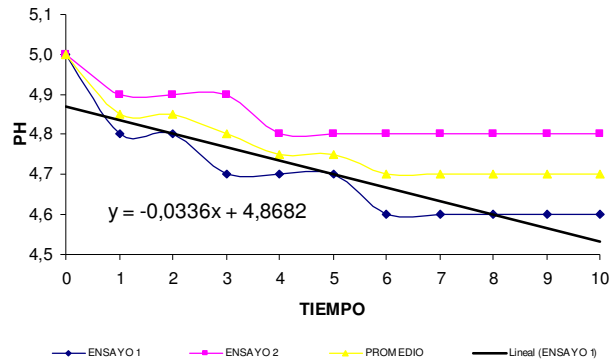


Figura No. 40: Ensayos a temperatura de 40°C

Tabla No. 41: Ensayos a temperatura de 50°C

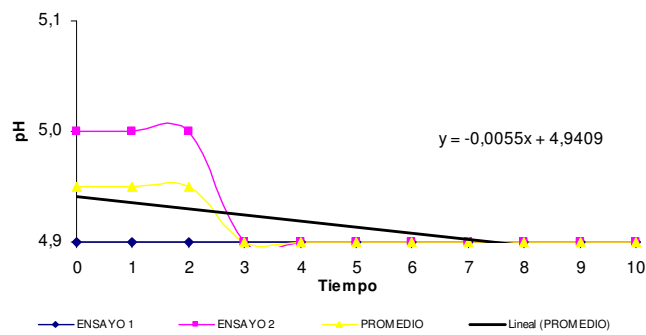
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,0	5,0	5,0
1	4,8	4,9	4,9
2	4,8	4,9	4,9
3	4,7	4,9	4,8
4	4,7	4,8	4,8
5	4,7	4,8	4,8
6	4,6	4,8	4,7
7	4,6	4,8	4,7
8	4,6	4,8	4,7
9	4,6	4,8	4,7
10	4,6	4,8	4,7



**Figura No. 41: Ensayos a temperatura de 50°C**

**Tabla No. 41: Ensayos a temperatura de 60°C**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	4,9	5,0	5,0
1	4,9	5,0	5,0
2	4,9	5,0	5,0
3	4,9	4,9	4,9
4	4,9	4,9	4,9
5	4,9	4,9	4,9
6	4,9	4,9	4,9
7	4,9	4,9	4,9
8	4,9	4,9	4,9
9	4,9	4,9	4,9
10	4,9	4,9	4,9

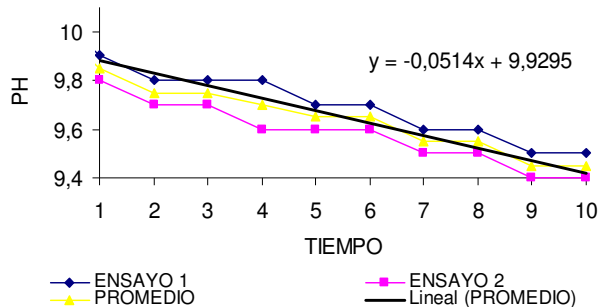


**Figura No. 41: Ensayos a temperatura de 60°C**

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA COMERCIAL GLUCOSA OXIDASA GOX MAXAZYME L 4000 INMOVILIZADA EN AGAROSA BAJO LOS PARÁMETROS TEMPERATURA 55°C Y pH 8**

**Tabla No. 42: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,05**

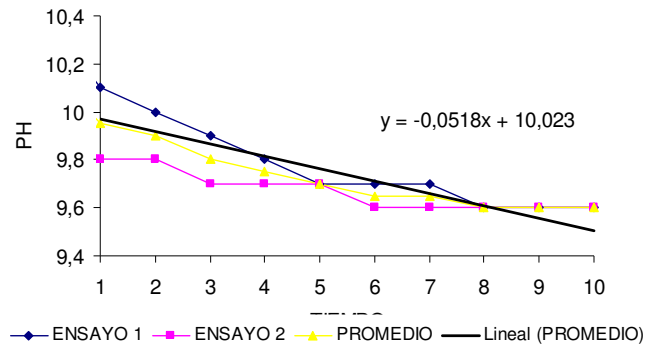
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	10,1	10	10,05
1	9,9	9,8	9,9
2	9,8	9,7	9,8
3	9,8	9,7	9,8
4	9,8	9,6	9,7
5	9,7	9,6	9,7
6	9,7	9,6	9,7
7	9,6	9,5	9,6
8	9,6	9,5	9,6
9	9,5	9,4	9,5
10	9,5	9,4	9,5



**Figura No. 42: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,05**

**Tabla No. 43: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,11**

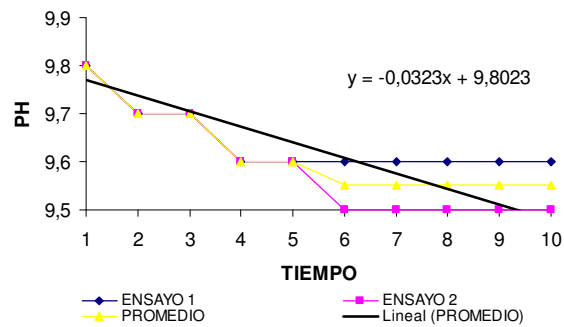
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	10,4	10	10,2
1	10,1	9,8	10,0
2	10,0	9,8	9,9
3	9,9	9,7	9,8
4	9,8	9,7	9,8
5	9,7	9,7	9,7
6	9,7	9,6	9,7
7	9,7	9,6	9,7
8	9,6	9,6	9,6
9	9,6	9,6	9,6
10	9,6	9,6	9,6



**Figura No. 43: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,11**

**Tabla No. 43: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,22**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	9,9	9,9	9,9
1	9,8	9,8	9,8
2	9,7	9,7	9,7
3	9,7	9,7	9,7
4	9,6	9,6	9,6
5	9,6	9,6	9,6
6	9,6	9,5	9,6
7	9,6	9,5	9,6
8	9,6	9,5	9,6
9	9,6	9,5	9,6
10	9,6	9,5	9,6



**Figura No. 43: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,22**

**Tabla No. 44: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,33**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	9,9	9,8	9,9
1	9,7	9,6	9,7
2	9,6	9,5	9,6
3	9,6	9,5	9,6
4	9,5	9,4	9,5
5	9,5	9,4	9,5
6	9,4	9,4	9,4
7	9,4	9,3	9,4
8	9,4	9,3	9,4
9	9,4	9,3	9,4
10	9,4	9,3	9,4

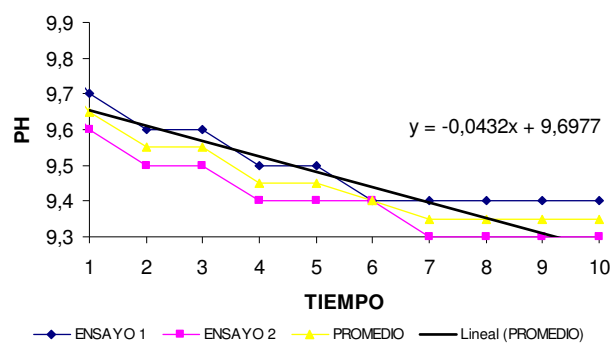
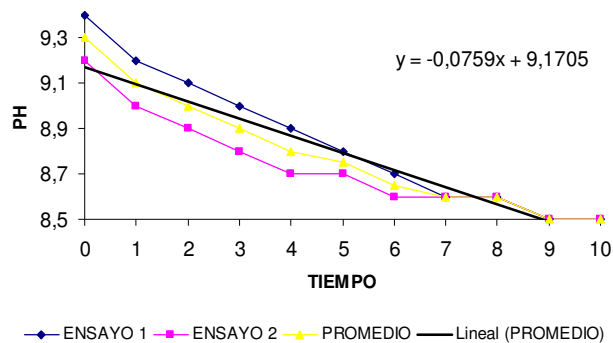


Figura No. 44: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,33

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	9,4	9,2	9,3
1	9,2	9	9,1
2	9,1	8,9	9,0
3	9,0	8,8	8,9
4	8,9	8,7	8,8
5	8,8	8,7	8,8
6	8,7	8,6	8,7
7	8,6	8,6	8,6
8	8,6	8,6	8,6
9	8,5	8,5	8,5
10	8,5	8,5	8,5

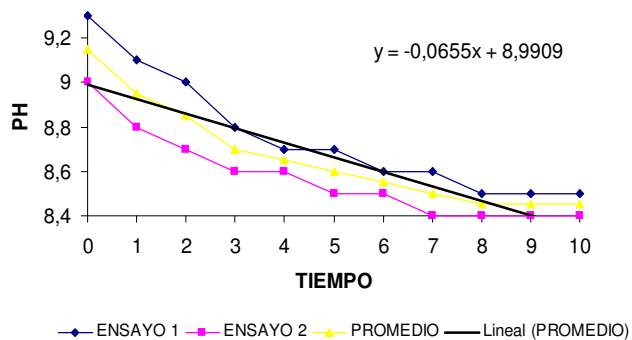
Tabla No. 45: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,44



**Figura No. 45: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,44**

**Tabla No. 46: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,55**

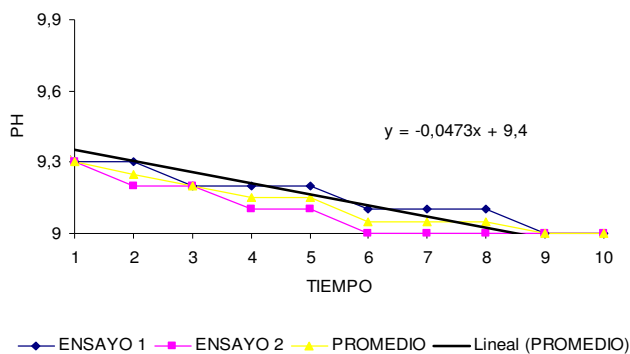
tiempo	ensayo 1	ensayo 2	promedio
0	9,3	9,0	9,2
1	9,1	8,8	9,0
2	9	8,7	8,9
3	8,8	8,6	8,7
4	8,7	8,6	8,7
5	8,7	8,5	8,6
6	8,6	8,5	8,6
7	8,6	8,4	8,5
8	8,5	8,4	8,5
9	8,5	8,4	8,5
10	8,5	8,4	8,5



**Figura No. 46: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,55**

**Tabla No. 46: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,83**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	9,6	9,6	9,6
1	9,3	9,3	9,3
2	9,3	9,2	9,3
3	9,2	9,2	9,2
4	9,2	9,1	9,2
5	9,2	9,1	9,2
6	9,1	9,0	9,1
7	9,1	9,0	9,1
8	9,1	9,0	9,1
9	9,0	9,0	9,0
10	9,0	9,0	9,0



**Figura No. 46: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 0,83**

**Tabla No. 47: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 1,11**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	9,6	9,5	9,6
1	9,5	9,4	9,5
2	9,3	9,3	9,3
3	9,3	9,3	9,3
4	9,2	9,3	9,3
5	9,2	9,2	9,2
6	9,2	9,2	9,2
7	9,2	9,1	9,2
8	9,2	9,1	9,2
9	9,2	9,1	9,2
10	9,2	9,1	9,2

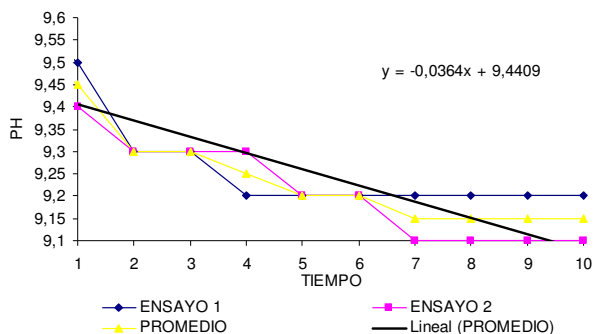


Figura No. 47: Ensayo % P/V Glucosa (Molar) 1,11

**EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA COMERCIAL GLUCOSA OXIDASA GOX MAXAZYME L 4000 INMOVILIZADA EN ALGINATO DE SODIO BAJO LOS PARÁMETROS TEMPERATURA 55°C Y CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO 0.44M**

Tabla No. 48: Ensayos a pH 2

tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	1,9	1,9	1,9
1	2,0	1,9	2,0
2	2,0	2,0	2,0
3	2,1	2,0	2,1
4	2,1	2,0	2,1
5	2,1	2,0	2,1
6	2,0	2,1	2,1
7	2,0	2,1	2,1
8	2,0	2,1	2,1
9	2,0	2,1	2,1
10	2,0	2,1	2,1

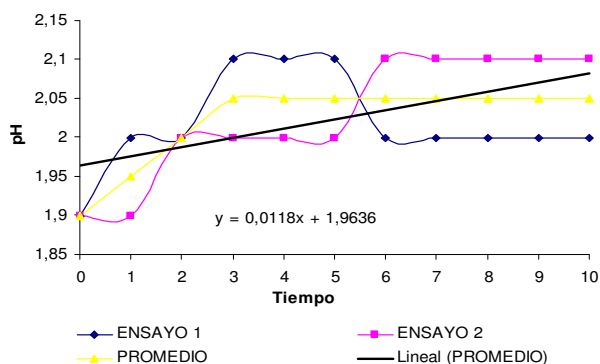


Figura No. 48: Ensayos a pH 2

Tabla No. 49: Ensayos a pH 3

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	2,9	2,9	2,9
1	2,9	2,9	2,9
2	3,0	3,0	3,0
3	3,0	3,1	3,1
4	3,0	3,1	3,1
5	3,1	3,1	3,1
6	3,1	3,1	3,1
7	3,1	3,1	3,1
8	3,1	3,1	3,1
9	3,1	3,1	3,1
10	3,1	3,1	3,1

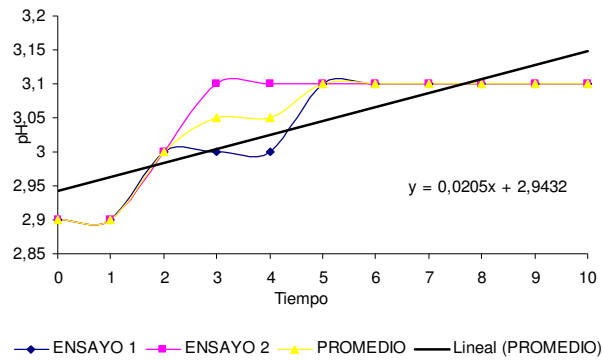
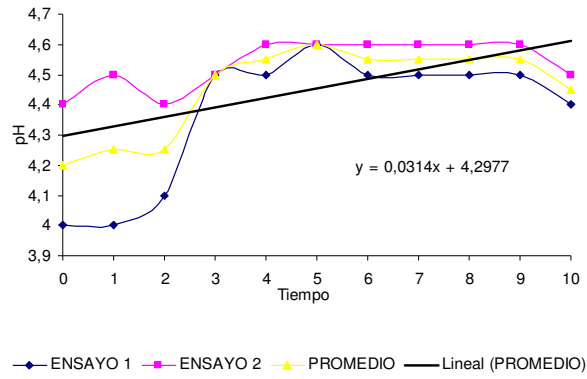


Figura No. 49: Ensayos a pH 3

Tabla No. 50: Ensayos a pH 4

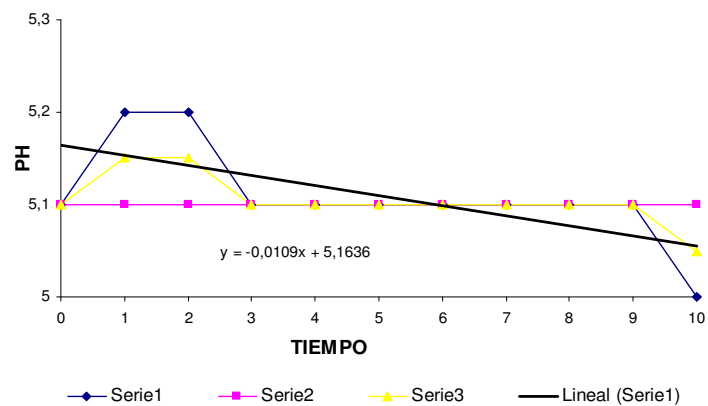
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	4	4,4	4,2
1	4	4,5	4,3
2	4,1	4,4	4,3
3	4,5	4,5	4,5
4	4,5	4,6	4,6
5	4,6	4,6	4,6
6	4,5	4,6	4,6
7	4,5	4,6	4,6
8	4,5	4,6	4,6
9	4,5	4,6	4,6
10	4,4	4,5	4,5



**Figura No. 50: Ensayos a pH 4**

**Tabla No. 51: Ensayos a pH 5**

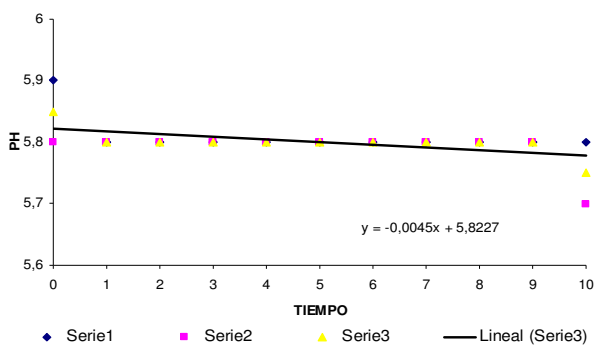
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,1	5,1	5,1
1	5,2	5,1	5,2
2	5,2	5,1	5,2
3	5,1	5,1	5,1
4	5,1	5,1	5,1
5	5,1	5,1	5,1
6	5,1	5,1	5,1
7	5,1	5,1	5,1
8	5,1	5,1	5,1
9	5,1	5,1	5,1
10	5,0	5,1	5,1



**Figura No. 51: Ensayos a pH 5**

**Tabla No. 52: Ensayos a pH 6**

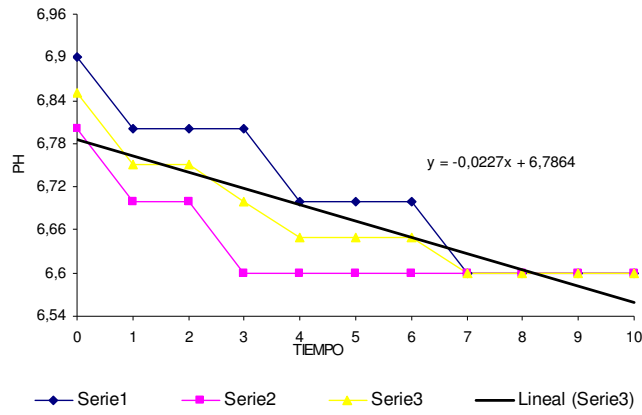
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,9	5,8	5,9
1	5,8	5,8	5,8
2	5,8	5,8	5,8
3	5,8	5,8	5,8
4	5,8	5,8	5,8
5	5,8	5,8	5,8
6	5,8	5,8	5,8
7	5,8	5,8	5,8
8	5,8	5,8	5,8
9	5,8	5,8	5,8
10	5,8	5,7	5,8



**Figura No. 52: Ensayos a pH 6**

**Tabla No. 53: Ensayos a pH 7**

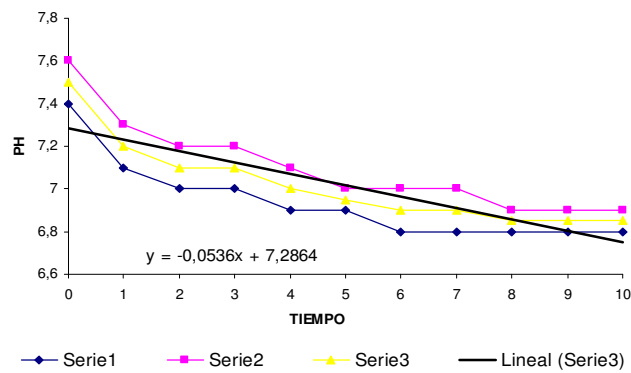
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	6,9	6,8	6,9
1	6,8	6,7	6,8
2	6,8	6,7	6,8
3	6,8	6,6	6,7
4	6,7	6,6	6,7
5	6,7	6,6	6,7
6	6,7	6,6	6,7
7	6,6	6,6	6,6
8	6,6	6,6	6,6
9	6,6	6,6	6,6
10	6,6	6,6	6,6



**Figura No. 53: Ensayos a pH 7**

**Tabla No. 54: Ensayos a pH 8**

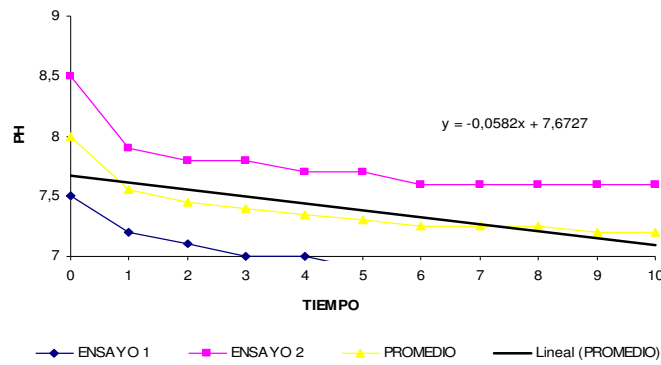
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	7,4	7,6	7,5
1	7,1	7,3	7,2
2	7,0	7,2	7,1
3	7,0	7,2	7,1
4	6,9	7,1	7,0
5	6,9	7,0	7,0
6	6,8	7,0	6,9
7	6,8	7,0	6,9
8	6,8	6,9	6,9
9	6,8	6,9	6,9
10	6,8	6,9	6,9



**Figura No. 54: Ensayos a pH 8**

**Tabla No. 55: Ensayos a pH 9**

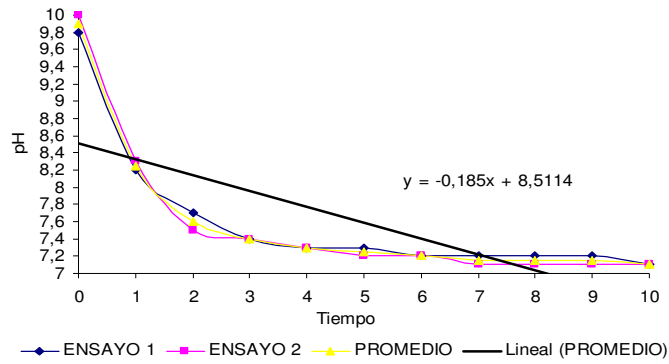
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	7,5	8,5	8,0
1	7,2	7,9	7,6
2	7,1	7,8	7,5
3	7,0	7,8	7,4
4	7,0	7,7	7,4
5	6,9	7,7	7,3
6	6,9	7,6	7,3
7	6,9	7,6	7,3
8	6,9	7,6	7,3
9	6,8	7,6	7,2
10	6,8	7,6	7,2



**Figura No. 55: Ensayos a pH 9**

**Tabla No. 56: Ensayos a pH 10**

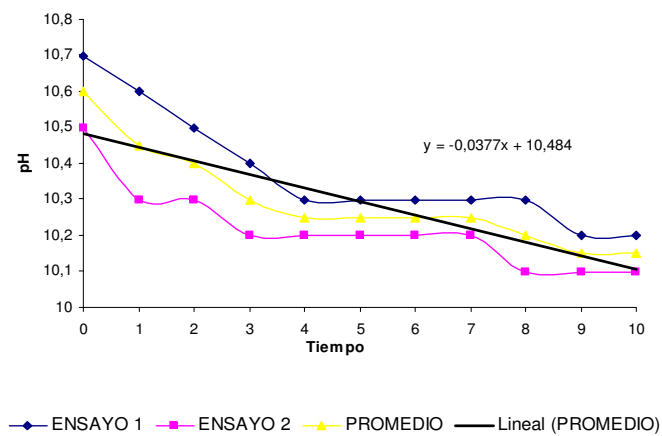
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	9,8	10	9,9
1	8,2	8,3	8,3
2	7,7	7,5	7,6
3	7,4	7,4	7,4
4	7,3	7,3	7,3
5	7,3	7,2	7,3
6	7,2	7,2	7,2
7	7,2	7,1	7,2
8	7,2	7,1	7,2
9	7,2	7,1	7,2
10	7,1	7,1	7,1



**Figura No. 56: Ensayos a pH 10**

**Tabla No. 57: Ensayos a pH 11**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	10,7	10,5	10,6
1	10,6	10,3	10,5
2	10,5	10,3	10,4
3	10,4	10,2	10,3
4	10,3	10,2	10,3
5	10,3	10,2	10,3
6	10,3	10,2	10,3
7	10,3	10,2	10,3
8	10,3	10,1	10,2
9	10,2	10,1	10,2
10	10,2	10,1	10,2

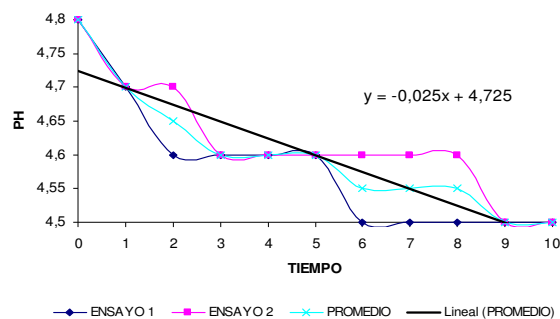


**Figura No. 57: Ensayos a pH 11**

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA COMERCIAL GLUCOSA OXIDASA GOX MAXAZYME L 4000 INMOVILIZADA EN ALGINATO DE SODIO BAJO LOS PARÁMETROS TEMPERATURA pH 5 Y CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO 0.44M**

**Tabla No. 58: Ensayos a temperatura de 35°C**

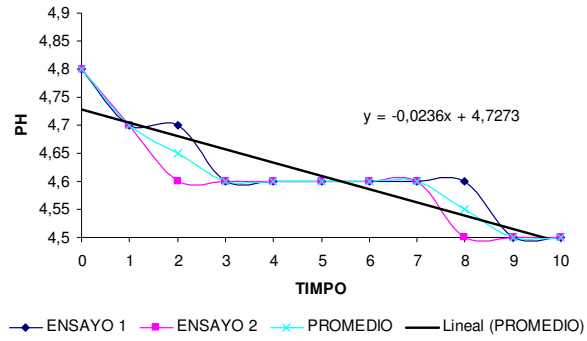
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	4,8	4,8	4,8
1	4,7	4,7	4,7
2	4,6	4,7	4,7
3	4,6	4,6	4,6
4	4,6	4,6	4,6
5	4,6	4,6	4,6
6	4,5	4,6	4,6
7	4,5	4,6	4,6
8	4,5	4,6	4,6
9	4,5	4,5	4,5
10	4,5	4,5	4,5



**Figura No. 58: Ensayos a temperatura de 35°C**

**Tabla No. 59: Ensayos a temperatura de 40°C**

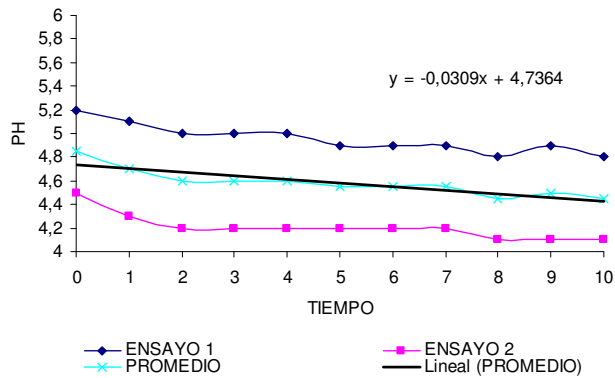
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	4,8	4,8	4,8
1	4,7	4,7	4,7
2	4,7	4,6	4,7
3	4,6	4,6	4,6
4	4,6	4,6	4,6
5	4,6	4,6	4,6
6	4,6	4,6	4,6
7	4,6	4,6	4,6
8	4,6	4,5	4,6
9	4,5	4,5	4,5
10	4,5	4,5	4,5



**Figura No. 59: Ensayos a temperatura de 40°C**

**Tabla No. 60: Ensayos a temperatura de 45°C**

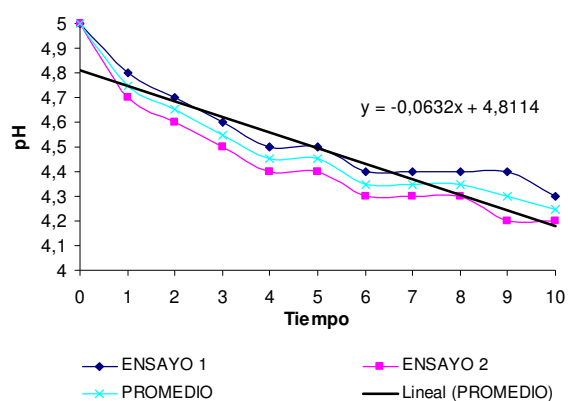
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,2	4,5	4,9
1	5,1	4,3	4,7
2	5	4,2	4,6
3	5	4,2	4,6
4	5	4,2	4,6
5	4,9	4,2	4,6
6	4,9	4,2	4,6
7	4,9	4,2	4,6
8	4,8	4,1	4,5
9	4,9	4,1	4,5
10	4,8	4,1	4,5



**Figura No. 60: Ensayos a temperatura de 45°C**

**Tabla No. 61: Ensayos a temperatura de 50°C**

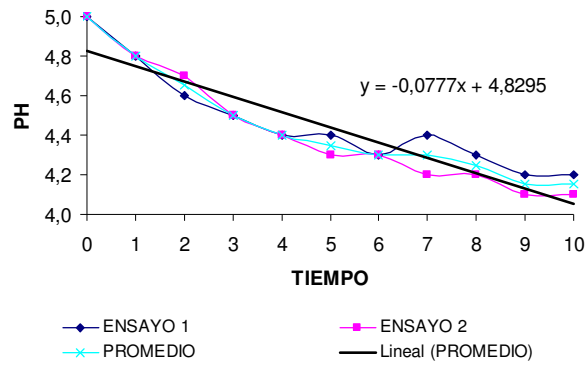
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5	5	5,0
1	4,8	4,7	4,8
2	4,7	4,6	4,7
3	4,6	4,5	4,6
4	4,5	4,4	4,5
5	4,5	4,4	4,5
6	4,4	4,3	4,4
7	4,4	4,3	4,4
8	4,4	4,3	4,4
9	4,4	4,2	4,3
10	4,3	4,2	4,3



**Figura No. 61: Ensayos a temperatura de 50°C**

**Tabla No. 61: Ensayos a temperatura de 55°C**

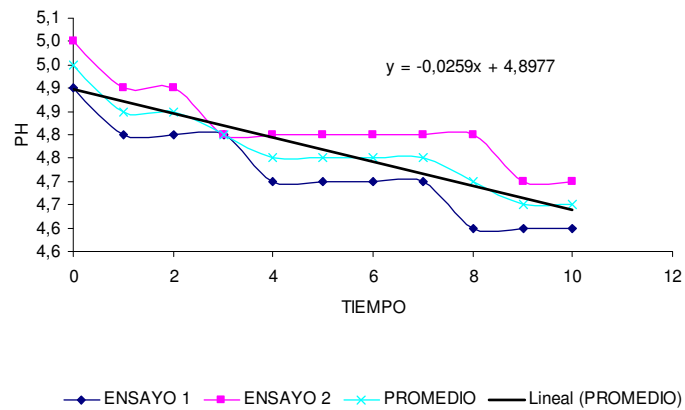
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,0	5,0	5,0
1	4,8	4,8	4,8
2	4,6	4,7	4,7
3	4,5	4,5	4,5
4	4,4	4,4	4,4
5	4,4	4,3	4,4
6	4,3	4,3	4,3
7	4,4	4,2	4,3
8	4,3	4,2	4,3
9	4,2	4,1	4,2
10	4,2	4,1	4,2



**Figura No. 61: Ensayos a temperatura de 55°C**

**Tabla No. 62: Ensayos a temperatura de 60°C**

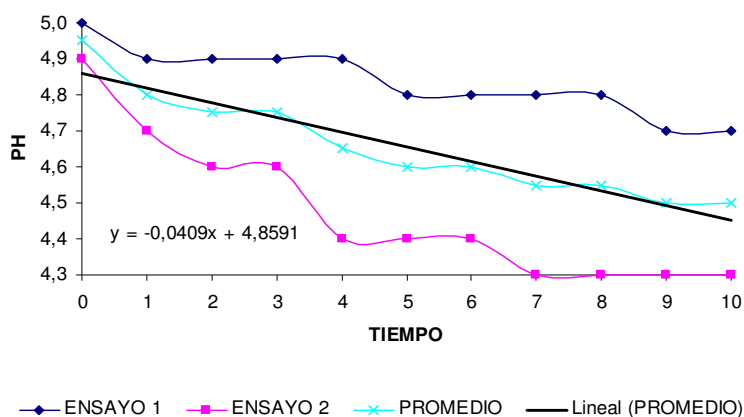
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	4,9	5,0	5,0
1	4,8	4,9	4,9
2	4,8	4,9	4,9
3	4,8	4,8	4,8
4	4,7	4,8	4,8
5	4,7	4,8	4,8
6	4,7	4,8	4,8
7	4,7	4,8	4,8
8	4,6	4,8	4,7
9	4,6	4,7	4,7
10	4,6	4,7	4,7



**Figura No. 62: Ensayos a temperatura de 60°C**

**Tabla No. 63: Ensayos a temperatura de 70°C**

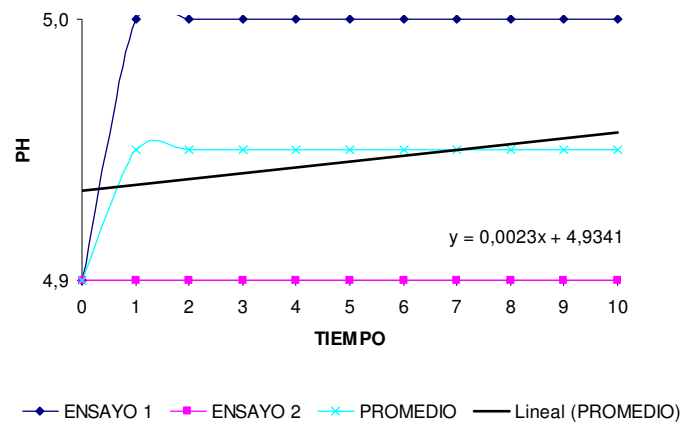
Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	5,0	4,9	5,0
1	4,9	4,7	4,8
2	4,9	4,6	4,8
3	4,9	4,6	4,8
4	4,9	4,4	4,7
5	4,8	4,4	4,6
6	4,8	4,4	4,6
7	4,8	4,3	4,6
8	4,8	4,3	4,6
9	4,7	4,3	4,5
10	4,7	4,3	4,5



**Figura No. 63: Ensayos a temperatura de 70°C**

**Tabla No. 64: Ensayos a temperatura de 80°C**

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
0	4,9	4,9	4,9
1	5,0	4,9	5,0
2	5,0	4,9	5,0
3	5,0	4,9	5,0
4	5,0	4,9	5,0
5	5,0	4,9	5,0
6	5,0	4,9	5,0
7	5,0	4,9	5,0
8	5,0	4,9	5,0
9	5,0	4,9	5,0
10	5,0	4,9	5,0



**Figura No. 64: Ensayos a temperatura de 80°C**

**ANEXO B. FICHA TECNICA ENZIMA GLUCOSA OXISADA MAXAXYME  
4000L**

**GLUCOSA OXIDASA**

**Descripción del producto:**

Maxazyme 4000L es una glucosa oxidasa y una catalasa líquida del *aspergillus niger* estandarizada a un mínimo de 1.500 unidades sarret por gramo.

**Función:** Si se elimina el oxígeno no hay oxidación. En el caso de los alimentos y bebidas esto puede ayudar a prolongar su vida útil y mantener la estabilidad del sabor y del color.

Uno de los métodos para lograrlo es usar la glucosa oxidasa y la catalasa para transformar el oxígeno y la glucosa en ácido glucónico. La ventaja de la *Glucosa oxidasa* es que es un producto natural que se usa en pequeñas cantidades a diferencia de los antioxidantes químicos.

Maxazyme 4000L es una *Glucosa oxidasa* que cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico. También tiene actividad como catalasa. La catalasa descompone el agua oxigenada en agua y oxígeno.

Maxazyme 4000L tiene una proporción perfecta de actividades de la glucosa oxidasa y catalasa activas que conservan el 80% de su actividad máxima entre los 20 y los 45 °C con un pH entre 3.0 a 6.5.

Cuando hay exceso de glucosa Maxazyme 4000L elimina el oxígeno. Entre los ejemplos están la desoxigenación de la cerveza para prolongar la frescura y la estabilidad en el sabor, la desoxigenación de los concentrados de jugos de frutas y de productos embotellados, enlatados, congelados o empacados.

Cuando hay exceso de oxígeno Maxazyme 4000L elimina la glucosa. Como ejemplo esta la

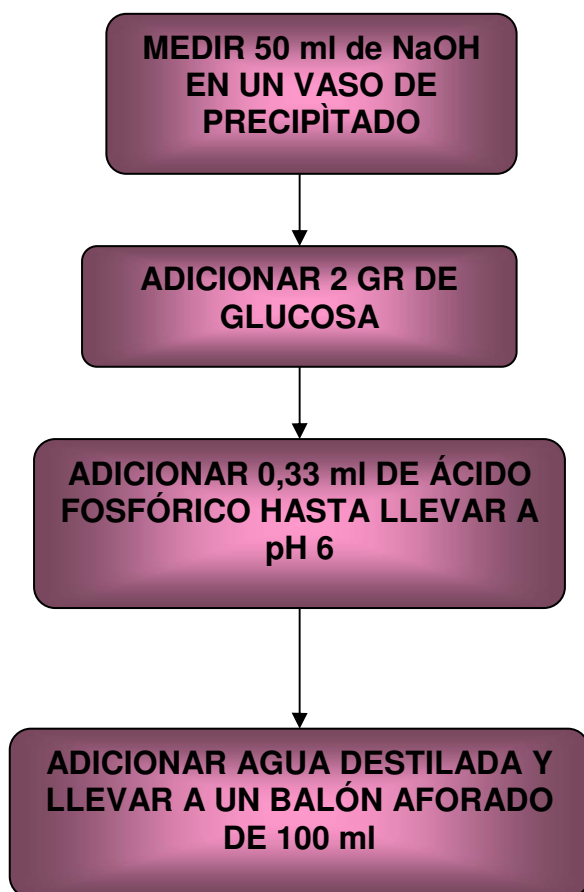
producción de bebidas secas.

**Empleo:**

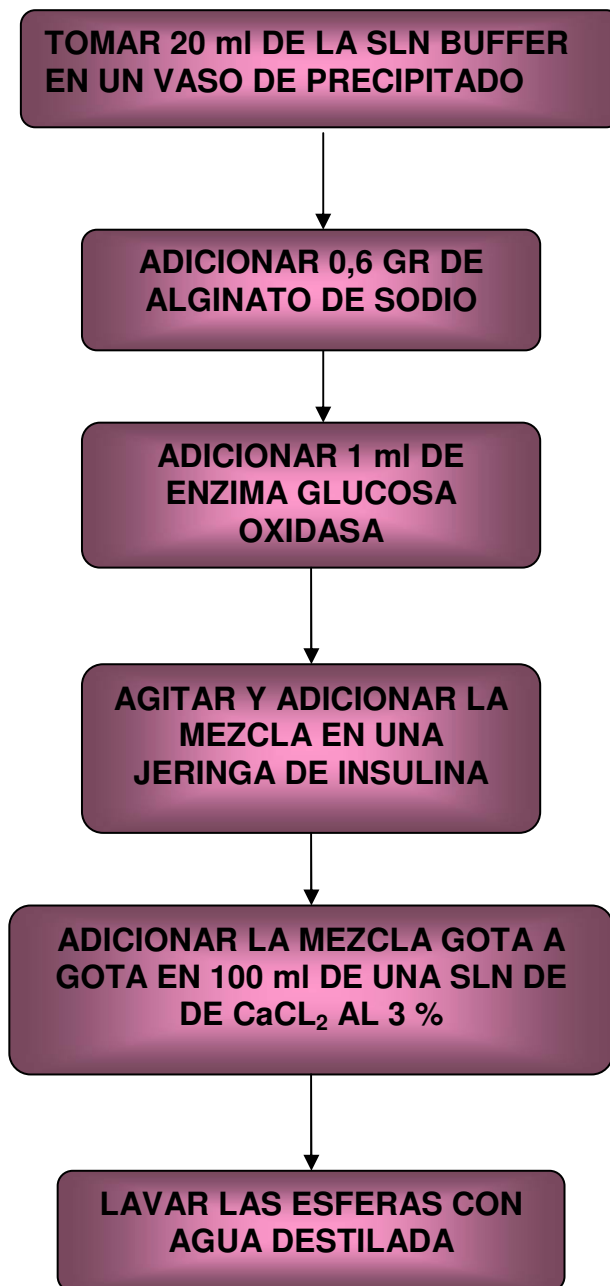
Se agregan 0.5 a 1.5 g por hectolitro de fruta se reduce el 90% del contenido de oxígeno en 30 minutos a temperatura ambiente, por lo que conserva la frescura del sabor y evita el cambio del color.

La formación de  $H_2O_2$  produce una reducción muy considerable de levaduras y de bacterias en el jugo de frutas antes de que sea descompuesto por la catalasa.

**ANEXO C. DIAGRAMA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN BUFFER 50 Mm**



**ANEXO D. DIAGRAMA DE LA INMOVILIZACION DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA EN ALGINATO DE SODIO**



**ANEXO E. DIAGRAMA DE LA INMOVILIZACION DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA EN AGAROSA**





Peter G, John. H (1990) 'Tecnología de las enzimas.' (Zaragoza España).

---

<sup>i</sup> ROBERT K., Murria, M:D:, Darly K., Granner, M.D., Mayers Peter A., Bioquímica de Harper- Editorial El Manual Moderno S:A. México, D.F. 1992.

<sup>ii</sup> FRANCESE Godia C., López Joseph S.- Ingeniería Bioquímica. Editorial Síntesis S.A. Madrid España 1998.