

24
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



U. N. A. M.

FALLA DE ORIGEN

**CINETICA DE OXIDACION DE GLUCOSA EN
MEDIOS ACUOSOS CATALIZADA POR LA
ENZIMA GLUCOSA OXIDASA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

NOEMI MONTOYA MONTELONGO

Asesor: Dr. Alberto Tecante Coronel

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO 1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES
U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



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

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

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de tesis titulada: "Cinética de Oxidación de Glucosa en Medios Acuosos Catalizada por la Enzima Glucosa Oxidasa"

que presenta la pasante: Noemi Montoya Montelongo con número de cuenta: 8958968-9 para obtener el TITULO de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

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

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 13 de Marzo de 1995

PRESIDENTE	<u>I.B.O. J. Francisco Montiel Sosa</u>
VOCAL	<u>O.F.B. S. Patricia Miranda Castro</u>
SECRETARIO	<u>Dr. Alberto Tecante Coronel</u>
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Ma. Elena Vargas Ugalde</u>
2do. SUPLENTE	<u>Dr. José Luis Arjona Román</u>

AGRADECIMIENTOS



BLANCA ESTELA MONTELONGO SALAS

Porque en ti fui, soy y seré.
Vive para quererte, Vive para cuidarte
Vive para agradecerte!!!
Te amo.

JULIO MONTOTA ROJAS

Por ser mi molde, modelo y escultor;
Gracias por existir y hacer de mi vida
una aventura interesante y feliz.
(Tu gen sucesor).

JULIO C. MONTOTA MONTELONGO

*Yesterday when I was Mr. Pessimist and
had a Hard day, I felt a Kind of magic with
your Invisible touch, you gave me Bad medicin
and said "Get on your feet Right here Right
now, come on ! Don't close your eyes just
Turn back the clock and As long as you follow
Don't stop believein', give yourself One more
try and Things will never be the same, Go your
own way Faithfully !".*
Love you 'Mr. Momo Music ©'

VIRGINIA P. MONTOTA MONTELONGO

Como un Ciclón que arrastra todo lo
que en su camino encuentra, así
arrancas sonrisas y amor a tu paso.
Generadora de cambios, Creadora de
energía.
Gracias por acompañarme con tu sueño
al cumplimiento del mío.

MARTIN DIAZ SANCHEZ

Si un actor representa muchos personajes,
Tú has sido Magistral como amigo, maestro,
pareja y más.
Gracias por experimentar conmigo esta trama,
cúmulo y gama de variantes.
Te quiero mucho Patol.

CUQUITA ARTEAGA

A mi abuelita "postiza", por su cariño,
apoyo y consejos en los buenos tiempos
y en los malos ¿Porqué no?.

DR. ALBERTO TEJCANTE CORONEL

"Hay que hacer de la vida un sueño y de los sueños una realidad" *Pierre Curie.*
Gracias por todo el tiempo y experiencias que de Usted recibí,
cuyo valor no puedo estimar.

A la memoria de mi Abuelito Julio Montoya Flores.

Gracias a mis amigos y familiares que han sido la fuerza y motor que me ha movido a ser quien soy.

Gracias a los Sinodales por el tiempo y comentarios dedicados a la conclusión de este trabajo.

**INDICE**

INTRODUCCION.....	1
CAPITULO I : MARCO TEORICO.....	7
1.1 Propiedades de la enzima glucosa oxidasa.....	8
1.1.1. Mecanismo de reacción.....	13
1.2. Actividad enzimática.....	16
1.2.1. Actividad de glucosa oxidasa.....	21
1.2.2. Actividad de catalasa.....	23
1.3. Cinética enzimática.....	24
1.4. Soluciones buffer.....	33
1.5. Transferencia de oxígeno.....	34
1.5.1. Electrodo de oxígeno.....	39
CAPITULO II : MATERIALES Y METODOS.....	42
2.1. Sistema de experimentación.....	43
2.2. Calibración del electrodo de oxígeno.....	46
2.3. Propiedades de glucosa oxidasa.....	51
2.3.1. Proteína.....	51
2.3.2. Concentración de flavín activo.....	51
2.3.3. Actividad de glucosa oxidasa.....	53
2.3.4. Actividad de catalasa.....	54
2.3.5. Constantes cinéticas.....	55



CAPITULO III : RESULTADOS Y DISCUSION.....	80
CAPITULO IV : CONCLUSIONES.....	78
LITERATURA CONSULTADA.....	82
ANEXOS.....	87
1.- Cuantificación de proteína. Método de Lowry (Folin-Ciocalteu).....	87
2.- Cálculo de solubilidad de oxígeno.....	91
3.- Preparación de soluciones buffer.....	98
4.- Ecuación de Michaelis-Menten.....	100

**LISTA DE TABLAS**

Tabla	Página
1. Especificidad de glucosa oxidasa.....	10
2. Comparación de las propiedades de 3 tipos fúngicos de glucosa oxidasa.....	11
3. Comparación de constantes cinéticas obtenidas por diferentes métodos.....	12
4. Niveles de variación experimental.....	55
5. Resultados de determinación de proteína.....	64
6. Resultados gráficos de las constantes cinéticas.....	75
7. Concentraciones del método de Lowry.....	88
8. Concentraciones opcionales del método de Lowry.....	89
9. Relación de soluciones para obtener buffer de fosfatos de determinado pH.....	96
10. Resultados experimentales de buffer de fosfatos.....	97
11. Relación de soluciones para obtener buffer de acetatos de determinado pH.....	98
12. Resultados experimentales de buffer de acetatos.....	99

**LISTA DE FIGURAS**

Figura	Página
1. Mecanismo de reacción de glucosa oxidasa.....	14
2. Estructura del Flavín Adenin Dinucleótido (FAD).....	17
3. Espectro de la forma oxidada del FAD.....	18
4. Estados redox de los grupos Flavín.....	19
5. Reacción enzimática lineal de orden cero.....	22
6. Determinación de la velocidad inicial.....	28
7. Sistema Ping Pong Bi Bi.....	29
8. Gráfica primaria.....	31
9. Gráfica secundaria.....	32
10. Sistema de experimentación.....	43



Figura	Página
11. Recipiente de reacción.....	44
12. Electrodo de oxígeno.....	46
13. Pasos de calibración del electrodo de oxígeno.....	47
14. Sistema de calibración del electrodo en gas.....	48
15. Sistema de calibración del electrodo en líquido.....	50
16. Respuesta del electrodo en gas.....	60
17. Respuesta del electrodo en líquido.....	60
18. Determinación de proteína I.....	62
19. Determinación de proteína II.....	63
20. Determinación de longitud de onda máxima 1.....	66
21. Determinación de longitud de onda máxima 2.....	66

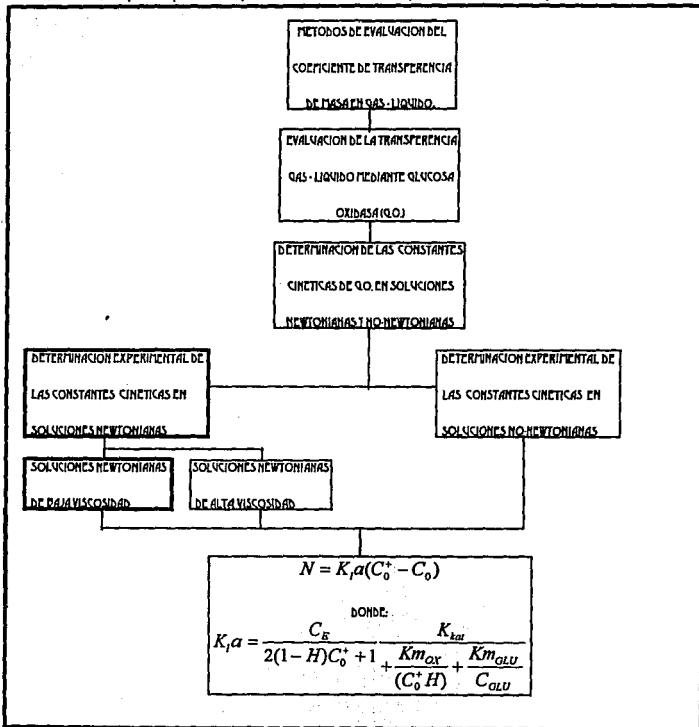


Figura	Página
22. Respuesta en la determinación de actividad de glucosa oxidasa.....	68
23. Gráfica sumatoria experimental.....	73
24. Gráfica primaria experimental.....	74
25. Gráfica secundaria experimental.....	75



OBJETIVOS

En el siguiente esquema se representa la idea generadora de este trabajo, haciendo énfasis en la parte que corresponde al desarrollo del presente estudio experimental.





En base a lo anterior, se plantea el Objetivo Principal a continuación:

Por medio del estudio de la cinética de oxidación de glucosa, determinar experimentalmente las constantes cinéticas de la enzima comercial de la enzima Glucosa Oxidasa (E.C. 1.1.3.4.) en un medio Newtoniano de baja viscosidad, para la evaluación de su potencial de uso en la transferencia de oxígeno.

Del cual derivan los siguientes Objetivos Secundarios:

Determinar experimentalmente las propiedades específicas del preparado enzimático comercial adquirido.

Establecer un sistema experimental y de análisis, tales que permitan determinar la cinética de oxidación de la glucosa.

Predecir el potencial de uso de las constantes cinéticas en la transferencia de masa.



INTRODUCCION

El uso de biorreactores en la industria alimentaria, farmacéutica y médica entre otras, es de suma importancia, debido a que en ellos pueden realizarse procesos de fermentación y obtención de biomasa entre otros. Para poder efectuar esta función es necesario considerar los factores que están involucrados en procesos de este tipo. La ingeniería bioquímica se ocupa, entre otras áreas, de estudiar los fenómenos de transferencia gas-líquido que se efectúan en procesos aerobios.

Ya que las operaciones de transferencia de masa son características de un componente y su entorno, existen variables a estimar en el reactor agitado, en las sustancias del medio (sustratos y productos), y en las condiciones para el microorganismo transformador, entre otras. Especialmente es necesario considerar la agitación y la aereación, que juntas están directamente relacionadas con el fenómeno de transferencia gas-líquido (que en este tipo de sistemas se trata de oxígeno-medio acuoso); además de la temperatura y presión empleados.

En los procesos aerobios que se efectúan en biorreactores, el indicador del desarrollo y la eficiencia de la transferencia de masa entre el gas que se introduce y el líquido o medio de cultivo, es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno $K_L a$; cuyo valor permite comparar la eficiencia de transferencia de masa en diferentes sistemas⁽³³⁾, que operan en condiciones similares. Por su importancia, se ha incrementado el número de métodos para la determinación del coeficiente; pero en general, si se considera la variación con el tiempo de la concentración de un gas que se disuelve en un líquido, los métodos para la determinación de $K_L a$ pueden clasificarse en estacionarios y no-estacionarios⁽³³⁾.



Estos métodos se basan en diferentes principios, desde la absorción y desorción de gases y propiedades paramagnéticas del oxígeno, hasta la reducción electroquímica del mismo: todos ellos con el fin de determinar la cantidad de oxígeno que se encuentra disuelto en el medio. Dentro del mismo concepto y con el avance en otras áreas, se ha llegado a proponer el uso de la enzima glucosa oxidasa (E.C. 1.1.3.4), que por su acción de oxidoreductasa es una opción de aplicación para la determinación de dicho coeficiente ya que su mecanismo de reacción incluye dos sustratos, la β -D-glucosa y el oxígeno, mediante los cuales se establece un ciclo en el que la enzima transfiere oxígeno a la glucosa para producir ácido glucónico.

Mediante el empleo de las constantes cinéticas de la reacción y la ecuación básica de transferencia de masa, se puede evaluar la velocidad de transferencia de oxígeno; siendo un hecho ventajoso de esta reacción enzimática su alta especificidad de acción catalítica y que las reacciones acompañantes no aceleran la velocidad de la absorción física del oxígeno en el sistema.

Esto representa una gran ventaja sobre los métodos que emplean reacciones químicas (p.ej. oxidación de sulfito de sodio) porque en éstos la presencia de catalizadores inorgánicos provocan que la absorción de oxígeno en el medio líquido se vea acelerada. Por lo tanto, el coeficiente volumétrico es mayor que el existente bajo condiciones de absorción física (solubilización) de oxígeno.

Por tanto, el presente trabajo forma parte de la idea esencial de la determinación experimental de las constantes cinéticas V_{max} (la velocidad de ambos sustratos a concentraciones infinitas), $K_{m_{Glucose}}$ y $K_{m_{O_2}}$ (la concentración que cada sustrato requiere para dar la mitad de su velocidad máxima en presencia de una concentración infinita del otro)⁽¹²⁾, de la enzima glucosa oxidasa, para su posible uso en las ecuaciones que describen el fenómeno de transferencia de masa gas-líquido y la determinación de K_{ja} en reactores.



La determinación de constantes cinéticas para las enzimas siempre es de utilidad; si se considera el hecho de que estos datos son escasos para preparaciones enzimáticas comerciales⁽²⁰⁾, las cuales no tienen un grado de pureza alto, debido a que son mezclas enzimáticas. **De aquí, la motivación de realizar un estudio para este tipo de productos disponibles comercialmente y sin purificaciones para su empleo en el estudio cinético.**

Cabe aclarar que los estudios cinéticos de este tipo requieren en rigor del uso de enzimas altamente purificadas si se consideran desde la perspectiva del bioquímico de enzimas. Sin embargo, para el ingeniero interesado en evaluar y comparar la eficiencia de aereación de un reactor, resulta poco práctico y costoso en tiempo y recursos hacer uso de preparaciones altamente puras porque se requiere esencialmente un método rápido, confiable y fácil de realizar en volúmenes comparablemente mayores que los usados en el laboratorio del bioquímico.

En consecuencia, **el propósito de este trabajo no es realizar un estudio fundamental de cinética enzimática, sino explorar la posibilidad de uso de una preparación comercial en la determinación de K_A . Para ello la primera etapa consiste en conocer el comportamiento cinético de dicho sistema.**

Las enzimas son de naturaleza proteínica, producidas por organismos vivos, que habitualmente sólo catalizan un tipo de reacción ó sólo una reacción determinada: La especificidad de las enzimas es tan marcada que en general, actúan exclusivamente sobre sustancias que tienen una configuración precisa, siendo en este caso la glucosa y el oxígeno los medios a emplear para verificar la reacción; a diferencia de los catalizadores inorgánicos que intervienen en numerosas reacciones⁽¹⁷⁾. Este hecho es una característica muy relevante en el presente trabajo, si se considera que precisamente otros métodos de determinación de K_A están limitados en la especificidad y reacciones alternas o secundarias.



Aunque las leyes generales de la catálisis deberían ser válidas para las enzimas, el hecho de que éstas sean sustancias complejas, de alto peso molecular, de tamaño coloidal y de composición difícil de precisar, impide la aplicación de dichas leyes de manera estricta⁽¹⁷⁾, siendo por tanto, atractiva la investigación referente a ellas y su comparación con respecto a otros métodos químicos o físicos.

Por otra parte si se realizan estudios de transferencia de oxígeno en medios de fermentación que contengan el microorganismo de interés, así como los solutos, se tienen problemas prácticos; ya que se requiere tener una cuidadosa preparación del medio, así como prevenir contaminaciones y tener un buen manejo en las condiciones del cultivo⁽³³⁾, se deba recurrir por tanto a un sistema modelo que simule en lo posible la mayoría de las condiciones reales del fenómeno de transferencia de oxígeno.

Debido a este hecho se plantea hacer el estudio de las constantes de la enzima, en un sistema de tanque agitado en condiciones óptimas para el desarrollo de la reacción con el uso de soluciones buffer o amortiguadoras; ya que se pretende tener en lo posible un sistema químico adecuado para la simulación de un caldo de fermentación tal que la velocidad de absorción de oxígeno dependa sólo del coeficiente de transferencia de masa⁽¹⁴⁾.

Muchos de los sistemas de interés involucran medios acuosos de elevada viscosidad y con comportamiento reológico complejo (no-Newtoniano); siendo esta la idea base del proyecto, del cual este trabajo forma una parte primaria o inicial empleando para este fin sólo medios acuosos de comportamiento Newtoniano y baja viscosidad. El estudio en medios reológicamente complejos es sin duda más complicado, lo que puede desviar el interés esencial de evaluar la potencialidad de las constantes cinéticas encontradas.



Es importante mencionar que en el mecanismo de reacción que lleva a cabo la glucosa oxidasa, la presencia de catalasa es fundamental, ya que previene la acumulación de peróxido de hidrógeno que es un producto intermediario y que puede inhibir la acción de la glucosa oxidasa⁽²⁰⁾, por esto en estudios anteriores ha sido añadida^(1,2,15,16) para asegurar que la cantidad de catalasa sea la suficiente para que la velocidad de conversión del peróxido en agua y oxígeno sea mucho más grande que la velocidad de transformación de β -glucosa y oxígeno a δ -D- gluconolactona y agua^(19,20).

Debido a lo anteriormente mencionado, el método para la determinación de la cinética toma en cuenta que el sistema está constituido por 2 enzimas, cuya interrelación debe considerarse tanto en la experimentación como en el análisis de resultados; haciéndose evidente su importancia si se desea plantear un balance de masa en el sistema.

La base sobre la cual se verifica la reacción de la enzima es el Flavín Adenin Dinucleótido (FAD), ya que la catálisis de las reacciones redox por flavoproteínas es debida al cambio entre su estado oxidado y reducido⁽⁷⁾; de aquí que la definición de la concentración de enzima debe hacerse en función a la molaridad de los grupos FAD^(12,19,20,37), y no con base en una cantidad de enzima disuelta en un cierto volumen. Esto es un hecho relevante que no ha sido considerado en algunos estudios y que se refiere en este trabajo como parte determinante en los resultados obtenidos.

Además la pureza de las preparaciones enzimáticas en estudios cinéticos es un factor de suma importancia ya que puede pensarse que las preparaciones muy puras son más deseables; sin embargo, existen estudios^(19,20) en los que se emplean preparaciones comerciales, debido a su conveniencia de uso en aplicaciones como la determinación de capacidad de aereación en fermentadores⁽²⁰⁾.



Los datos cinéticos obtenidos a partir de la enzima cruda son escasos, además de que generalmente los preparados comerciales contienen además de glucosa oxidasa, ciertas cantidades de catalasa e invertasa entre otras⁽²⁷⁾, siendo por tanto, una mezcla enzimática que debe ser considerada como tal.

Como se mencionó, en este trabajo uno de los objetivos es manejar los preparados enzimáticos existentes comercialmente sin hacer purificaciones posteriores, debido a que en posibles usos en fermentadores o modelos de fermentación el realizar pasos de purificación resultaría impráctico, por lo que en este trabajo se pretende la obtención de datos cinéticos de la enzima comercial.



CAPITULO I

MARCO TEORICO

En el estudio general de una enzima existen diferentes propiedades específicas que en lo posible deben conocerse, por ejemplo⁽⁷⁾:

- **Proteínicas.** Sedimentación y constantes de difusión, peso molecular, punto isoeléctrico, estabilidad hacia el pH, calor y espectro de absorción entre otras.
- **Estructurales.** Presencia de grupos prostéticos, grupo espacial ó átomo de metal, número de grupos prostéticos por molécula, su naturaleza y modo de ataque y el efecto de agentes químicos entre otros.
- **Enzimáticas.** Naturaleza de la reacción, cuándo una coenzima está involucrada, su naturaleza y modo de acción, especificidad para un sustrato, si la reacción es reversible y especificidad hacia inhibidores, etc.
- **De Centro activo.** Cuántos por molécula, estructura química, efecto en el sustrato de su combinación con el centro activo, mecanismo de acción del grupo prostético.
- **Cinéticas.** Actividad específica, actividad molecular, actividad absoluta por centro activo, constantes de velocidad en combinación con el sustrato, secuencia de los pasos de reacción y la ecuación de velocidad y su interpretación en terminos de sitios de unión.
- **Termodinámicas.** Reversibilidad y constante de equilibrio de la reacción, energías de activación del complejo enzima-sustrato, de conversión de este en complejo enzima-producto, y de disociación de este en enzima libre y producto, afinidad de la enzima por su sustrato, la constante de Michaelis, entre otras.



De acuerdo a lo anterior, en este estudio se establecen tanto bibliográfica como experimentalmente las propiedades útiles anteriores tales que permiten la determinación de las constantes cinéticas en soluciones buffer.

1.1. PROPIEDADES DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA

La existencia de la enzima glucosa oxidasa se conoce desde 1904, cuando se demostró que extractos de *A. niger* tenían la capacidad de oxidar glucosa. En los años cuarentas, se pensó que era un tipo de penicilina y se le denominó notatina, penicilina A y posteriormente penicilina B, debido al efecto bactericida del peróxido de hidrógeno que se produce durante la reacción que cataliza^(1,27), pero el nombre sugerido por la Comisión de Nomenclatura de Enzimas es glucosa oxidasa⁽³⁸⁾.

La enzima glucosa oxidasa (β -D-glucosa:oxígeno reductasa) tiene el número de clasificación 1.1.3.4 y se encuentra en algunos hongos como el *Penicillium glaucum*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium amagasakiense*, *Penicillium notatum*, siendo su principal fuente *Aspergillus niger* ⁽²⁷⁾. No ha sido encontrada en plantas ó animales. Los rangos de pH y temperatura así como la presencia y tipo de coenzima son tan semejantes que permiten utilizar cualquier fuente para su uso industrial⁽³⁾.

Esta enzima es una flavoproteína, que lleva a cabo la catálisis por el cambio entre su estado oxidado y reducido⁽³⁶⁾, siendo el Flavín Adenín Dinucleótido (FAD) la base de este sistema redox.

La presencia del grupo FAD fué demostrada por Keilin y Hartree⁽¹⁾, que desnaturalizaron la enzima y observaron que bajo luz ultravioleta no mostraba fluorescencia. El peso molecular calculado de los datos ópticos es de 78 000 y debido a que el peso de la enzima es de 150 000 entonces contiene 2 moles de FAD por mol de proteína de la enzima⁽¹⁾.



Las enzimas de los diferentes hongos que la producen son similares, ya que todas tienen pesos moleculares cercanos a 150 000; así como el punto isoeléctrico cercano a 4.2⁽³⁸⁾. Existe una correlación directa entre el contenido de flavin y la actividad enzimática. La enzima altamente purificada es amarilla y contiene 2 moléculas de FAD por molécula de enzima. Si se remueven los grupos FAD se pierde completamente la actividad. La glucosa oxidasa en su forma oxidada, tiene una absorbancia máxima de 280 nm típica de todas las proteínas, además en condiciones aeróbicas aparecen otros 2 máximos a 377 y 455nm debidos a la presencia de FAD.

Kellin y Hartree⁽¹⁾ demostraron que la enzima es altamente específica a la β-D-glucopiranososa ya que la oxida cerca de 160 veces más rápidamente que a la forma α, debido a que existe un absoluto requerimiento del grupo hidroxil en el carbono 1⁽³⁸⁾.

En la siguiente tabla se muestra la especificidad relativa, considerando la actividad sobre β-Dglucopiranososa como 100⁽³⁾.

TABLA 1
ESPECIFICIDAD DE GLUCOSA OXIDASA^(9,38)

SUSTRATO	CAMBIOS DE β -D-GLUCOSA	ESPECIFICIDAD RELATIVA (%)
β -D-glucosa	-----	100.0
α -D-glucosa	configuración del OH en C ₁	0.64
6-Metilglucosa		1.85
4:6-Dimetilglucosa		1.22
D-Manosa	configuración del OH en C ₂	0.98
Xilosa	reemplazo en C ₆ con H	0.98
Trehalosa		0.28
Maltosa		0.19
D-Galactosa	configuración del OH a C ₄	0.14 ⁽⁹⁾ y 0.5 ⁽³⁸⁾
Melibiosa		0.11
Celobiosa		0.09
Ac. Glucurónico		0.05
Ac. Galacturónico		0.05
2-Aminoglucosa		0.05
2-Aminogalactosa		0.05
6-desoxi-6-fluoro-D-glucosa		3.00
4:6-Benzilideno-D-glucosa		1.90
6-Metil-D-glucosa		1.85
4-Desoxi-D-glucosa	reemplazo de OH en C ₄ por H	2.0
5-Desoxi-D-glucosa	reemplazo de OH en C ₅ por H (no puede formarse el anillo)	0.05
6-Desoxi-D-glucosa	reemplazo de OH en C ₆ por H	10.0
L-glucosa	configuración en C ₅	0.0
1-5-Anhidro-D-glucitol	reemplazo de OH en C ₁ con H	0.0



A continuación se presenta una tabla con las propiedades más relevantes para la glucosa oxidasa obtenida de tres tipos de hongos⁽³²⁾.

TABLA 2
PROPIEDADES DE TRES TIPOS FUNGICOS DE GLUCOSA OXIDASA

PROPIEDAD	<i>A. niger</i>	<i>P.amagasakiense</i>	<i>P.notatum</i>
λ_{max} (m μ)	278, 383, 452	278, 380, 460	270-280, 377, 455
K _m glucosa, en aire catalasa presente, pH 5.6	0.033M a 25°C	0.015M a 30°C	0.0096M a 20°C 0.0042M a 39°C
Coefficiente de extinción del flavín a 450 m μ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	1.41*10 ⁴	1.10*10 ⁴	1.09*10 ⁴
S ₂₀ (S) ^a	8.00	7.93	8.27
D ₂₀ (cm ² s ⁻¹)	4.12*10 ⁻⁷	5.02*10 ⁻⁷	5.13*10 ⁻⁷
Peso molecular	188, 000	154, 000	152, 000
Actividad específica estandarizada a 25°C ^b	80	112 ^c , 77 ^d	64

^a Los valores de S y D están expresados como concentración de proteína cero (excepto para la enzima *P.notatum* que fué medida a un valor de 3.6 mg/ml).

^b La actividad específica estandarizada tiene unidades de micromoles por minuto por miligramo (polvo seco). Otras condiciones son concentración infinita de glucosa, oxígeno 0.25mM, exceso de catalasa y buffer de fosfato o acetato, pH 5.6.

^c Kusal (1960).

^d Nakamura y Ogara (1962).

A continuación se presenta una tabla con los valores cinéticos obtenidos por Gibson (1964) por el método 'stopped flow' para *A. niger*⁽¹²⁾ y los obtenidos por otros métodos:

TABLA 3
COMPARACION DE CONSTANTES CINETICAS
OBTENIDAS POR DIFERENTES METODOS

Sustrato	pH	Temp. (°)	V _{máx} (seg ⁻¹ M)	K _m glucosa (M)	K _m oxígeno x10 ⁻³ (M)	Referencia
Glucosa	5.6	0	235	0.12	0.210	Gibson
Glucosa	5.6	13	590	0.11	0.290	Gibson
Glucosa	5.6	27	1150	0.11	0.480	Gibson
Glucosa	5.6	38	2000	0.12	0.830	Gibson
Glucosa	5.55	25	1152 [⊙]	0.0923	0.563	Linek et al.
Glucosa	5.55	25	1440 [⊙]	0.11	0.820	Bright y Gibson
Glucosa	5.6	30	1433 [⊙]	0.0802	0.537	Duke et al.
Glucosa	5.2	30	1309 [⊙]	0.0217	11.48	Fukushima et al.
2- Desoxiglucosa		0	15	0.025	-----	Gibson
2- Desoxiglucosa		25	50	0.04	0.030	Gibson

NOTA: Los valores que tienen (⊙) se encuentran expresados en M. Los valores se obtuvieron con enzima purificada.



La glucosa oxidasa es una excepción al grupo de las oxidasas ya que no contiene iones metálicos como cofactores esenciales, además de su alta especificidad por su sustrato.

En lo que se refiere a estabilidad, la glucosa oxidasa como sólido cristalino es estable por lo menos 2 años a 0°C y 8 años a -15°C. Las soluciones acuosas al 0.1% y 0.2% son estables durante una semana a 5°C (1,3).

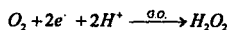
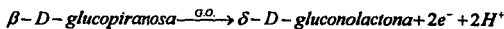
Tiene un pH óptimo de 5.6, siendo muy inestable a valores más altos a 8.0; ya que a 8.1 después de 10 minutos sólo quedará el 10% de la actividad inicial, siendo más rápido el proceso a pH 9.0. Se considera que la enzima es estable entre pH 3.5 y 7.0(1).

La enzima no es inhibida por sustancias tales como alcoholes y uretanos, HCN, H₂S ni HN₃. La actividad oxidativa se reduce sólo 15% por la adición de cualquier otro azúcar; sin embargo se ha reportado que la D-arabinosa y 2-desoxi-D-glucosa inhiben la glucosa oxidasa de *A.niger* (3).

1.1.1. MECANISMO DE REACCION

Franke y Lorenz(1) dilucidaron el mecanismo de la enzima, notando que cataliza la transferencia de átomos de hidrógeno de la glucosa al oxígeno de la fase gaseosa. También encontraron que el desarrollo de la acidez debida a la formación de ácido gluconico no está directamente relacionado al proceso enzimático. Posteriormente mediante observaciones polarimétricas se demostró que el producto primario es la D-gluconolactona(1).

En la clasificación propuesta por Mason para enzimas que metabolizan oxígeno, la glucosa oxidasa está representada por las siguientes ecuaciones:

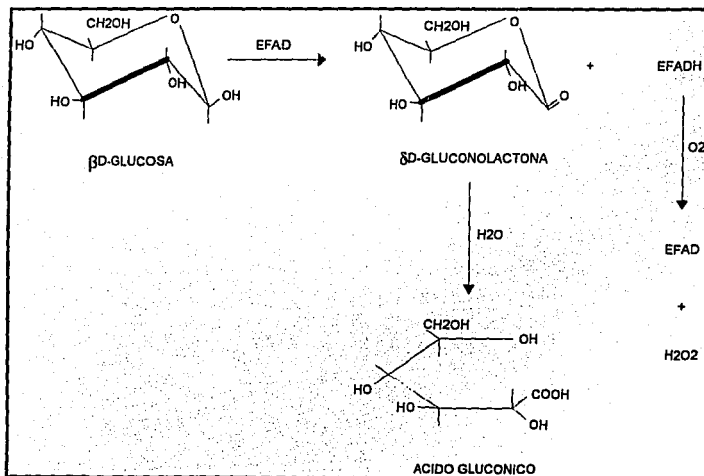


La forma oxidada de la enzima funciona como una deshidrogenasa al extraer 2 hidrógenos de la β -D-glucosa para formar la enzima reducida y la δ -D-gluconolactona. En un paso subsecuente la δ -D-gluconolactona se hidroliza no enzimáticamente a ácido D-gluconico y la enzima reducida se reoxida por oxígeno molecular mediante un paso enzimático⁽³⁸⁾.

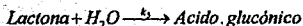
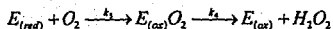
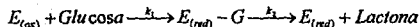
Por otra parte el oxígeno convierte la forma reducida de la enzima a su forma oxidada, generando peróxido de hidrógeno como producto. A continuación se muestra la figura 1 con el mecanismo de acción completo.

FIGURA 1

MECANISMO DE REACCION DE GLUCOSA OXIDASA



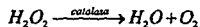
Gibson⁽³⁾ encontró espectrofotométricamente que existen sólo dos formas de la enzima, la enzima oxidada (E-FAD) y la reducida (E-FADH₂), pertenecientes al ciclo en el que se encuentra la enzima transfiriendo oxígeno a la glucosa para producir el ácido glucónico; siendo una excepción a otras flavoproteínas, el Intermediario semiquinónico no participa en la reacción⁽³⁶⁾, siendo las reacciones parciales⁽³⁾:



Por los datos obtenidos de diferentes investigadores se sabe que el tiempo de vida del complejo enzima - sustrato es de muy corta duración y que la velocidad de disociación de la lactona aumenta con la temperatura, ya que arriba de los 20°C el proceso es instantáneo⁽³⁾.

La rápida reoxidación de E_(red) con oxígeno, para regenerar E_(ox) es predominante a valores de pH menores a 7⁽³⁷⁾.

El sistema anterior queda completo si se añade la siguiente reacción⁽⁹⁾:



Las preparaciones de la enzima glucosa oxidasa generalmente contienen otras enzimas, entre las que se cuenta la catalasa; que en la totalidad del sistema de reacción tiene un papel importante al prevenir la acumulación de peróxido nocivo para la glucosa oxidasa; debido a este hecho, generalmente se adiciona una cantidad extra al sistema para prevenir pérdidas en la actividad. Por tanto, la cinética es un proceso de reacciones consecutivas de dos enzimas⁽³⁶⁾.



1.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Al expresar la actividad enzimática puede hacerse de diversas formas, por ejemplo; específica, molecular y de centro activo entre otras, siendo esta última la de importancia en el caso de enzimas que contienen un grupo prostético ó centro catalítico cuya concentración puede ser conocida⁽⁷⁾.

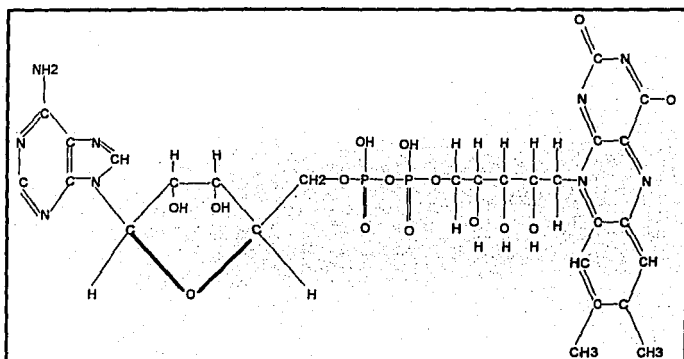
Debido a la cinética que sigue la enzima glucosa oxidasa, el FAD (Flavín Adenin Dinucleótido) es la base sobre la cual puede especificarse la reacción, ya que la catálisis de las reacciones redox por flavoproteínas es debida al cambio entre su estado oxidado y el reducido⁽⁷⁾; de aquí que la presencia y cuantificación de estos grupos sea determinante al hacer las consideraciones sobre la concentración que se empleará en los cálculos posteriores.

Como se mencionó, todas las concentraciones de enzima se expresan como molaridad de FAD activo^(12,19,20,37); tomarlo con base en el peso de la enzima es un error en el que varios autores de trabajos anteriores⁽²⁰⁾ han incurrido y que no permite la consideración de los valores obtenidos, porque generalmente no se conoce a qué pureza de enzima se han realizado estos experimentos.

Es importante mencionar que la parte proteínica determina tanto la especificidad para el grupo flavín hacia los aceptores (y por tanto precisa la clase funcional a la cual la flavoproteína pertenece), como el mecanismo de la reacción catalizada.

Se conocen cerca de 80 enzimas flavoproteínicas, siendo el FAD el grupo prostético que contienen la mayoría de ellas⁽⁷⁾. En la figura 2 se muestra la estructura del FAD.

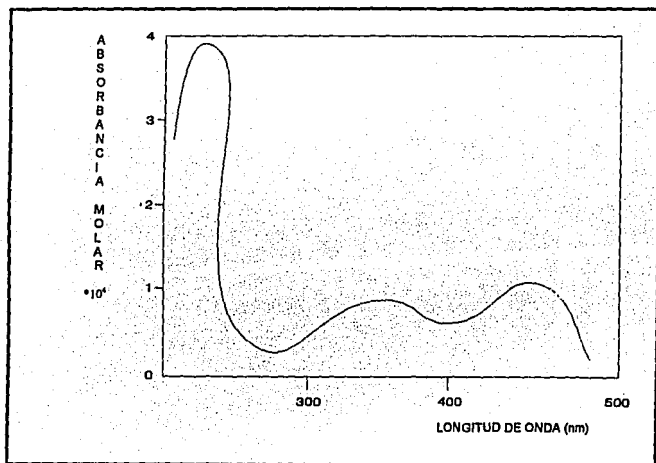
FIGURA 2
ESTRUCTURA DEL FLAVIN ADENIN DINUCLEOTIDO (FAD)



El flavín adenín dinucleótido tiene la fórmula condensada $C_{27}H_{33}O_{15}N_9P_2$ con un peso molecular de 785 g/mol.

La forma oxidada del FAD genera sustancias fluorescentes amarillas, que en su estado reducido pierden estas características, siendo evidente este hecho en la banda de 450 nm. En la figura 3 se muestra el espectro para la forma oxidada del FAD⁽⁷⁾.

FIGURA 3
ESPECTRO DE LA FORMA OXIDADA DEL FAD

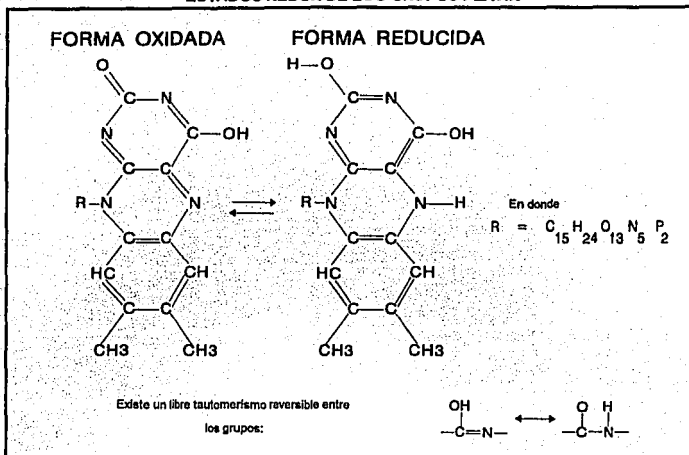


Cabe hacer notar que la figura anterior muestra el espectro del flavín libre, siendo sus características (especialmente la fluorescencia) un poco diferentes cuando se encuentra combinado con la enzima.

El proceso de reducción se lleva a cabo por la adición de 2 átomos de hidrógeno, como se muestra en la figura 4, referida a los 2 estados del flavín⁽⁷⁾.

FIGURA 4

ESTADOS REDOX DE LOS GRUPOS FLAVIN



En la reacción esto se verifica ya que la forma oxidada de la enzima funciona como una deshidrogenasa al extraer 2 hidrógenos de la β -D-glucosa para formar la enzima reducida⁽²⁷⁾, evaluándose esto espectrofotométricamente tomando como base la ley de Bouguer-Lambert-Beer para la absorción de luz por una sustancia absorbente en un solvente que no interfiera con la prueba.

Para soluciones muy diluidas:

$$E = \eta cd \quad \text{ó} \quad A = \eta cl$$



En donde :

E= extinción ó absorbancia.

c= concentración molar.

d= paso de celda (cm)

η = coeficiente de extinción molar diferencial; que para 450 nm tiene un valor de

$$1.31 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ en acetato de potasio } 0.01\text{M} \text{ y pH } 5.5 \text{ (37)}.$$

El coeficiente de extinción molar diferencial representa la relación entre la forma oxidada y reducida del FAD unido a la enzima⁽³⁷⁾. Por tanto, aunado este concepto a la determinación de la absorbancia para la forma oxidada (la iniciadora de la reacción con la glucosa); se puede evaluar la concentración de FAD en molaridad.

Las unidades para η son:

$$\eta = \frac{\log \frac{I_0}{I}}{c \cdot d} [=] \text{cm}^2 / \text{mol}$$

Es más conveniente emplear las unidades de mol/litro (M) para la concentración, por tanto el coeficiente toma las unidades de $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (34).

La glucosa oxidasa en su forma oxidada tiene un máximo de absorbancia a 280 nm, típica de todas las proteínas y otros máximos a 377 y 455 nm debidos al FAD⁽²⁷⁾. Siendo este último punto el objetivo principal a determinar para la muestra de enzima.



1.2.1. ACTIVIDAD DE GLUCOSA - OXIDASA

La actividad enzimática debe medirse bajo condiciones tales que la velocidad varíe en proporción directa a la concentración de la enzima. Esto ocurre a altas concentraciones de sustrato, en donde la velocidad alcanza $V_{m\acute{a}x}$ y cinética de orden cero.

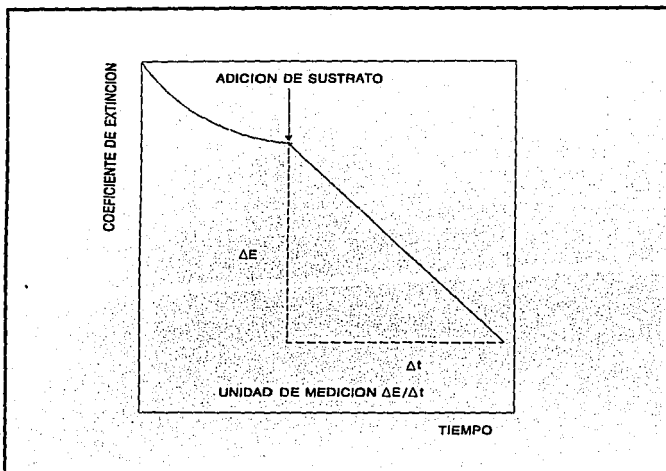
Una unidad internacional (U) es la actividad enzimática que provoca la reacción de 1 micromol de sustrato en un minuto⁽³⁴⁾ ó cuando más de una unión de cada molécula de sustrato es atacada⁽⁷⁾. La fuerza iónica, el pH y la temperatura deben especificarse y se sugiere que cuando sea posible debe ser 25°C.

Cuando una enzima tiene un grupo prostético ó centro catalítico (como la glucosa oxidasa), cuya concentración puede ser conocida, el poder catalítico debe expresarse como 'actividad de centro catalítico' y se define como el número de moléculas de sustrato transformados en un minuto por centro catalítico.

Como se mencionó la actividad enzimática se mide por la velocidad de la reacción catalizada en saturación; ya que así se obtiene $V_{m\acute{a}x}$ ⁽³⁴⁾ y la cinética se aproxima al orden cero⁽⁷⁾, antes de que el sustrato comience a ser escaso y se obtenga una velocidad de consumo constante.

En la figura 5 se muestra esquemáticamente un ejemplo de una reacción enzimática; siendo de orden cero y curso lineal⁽³⁴⁾.

FIGURA 5
REACCION ENZIMATICA LINEAL DE ORDEN CERO



Cuando se tienen curvas no lineales, los intervalos entre las mediciones deben ser menores, además de que la actividad está basada en la velocidad inicial⁽³⁴⁾; para evitar complicaciones debidas a la reversibilidad de las reacciones o la formación de productos inhibitorios⁽⁷⁾.



1.2.2. ACTIVIDAD DE CATALASA

Quando se cuenta con una preparación comercial, como en el caso de la glucosa oxidasa SP 358 (BIOTECESA), deben considerarse las 'contaminaciones' por otras enzimas como la catalasa ó invertasa⁽²⁷⁾.

En la reacción que lleva a cabo la glucosa oxidasa, la presencia de catalasa es fundamental y de hecho en experimentos precedentes se ha añadido^(9,12,19,20) con la finalidad de prevenir la acumulación de peróxido de hidrógeno que puede inhibir la acción de la glucosa oxidasa; en otros casos se puede añadir además lactonasa⁽²⁰⁾ para obtener el ácido gluconico.

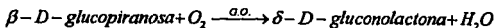
La cinética del sistema de glucosa oxidasa cuando se añade catalasa incluye las reacciones consecutivas de las dos enzimas. Sin embargo, si la concentración de la catalasa es más alta que la requerida para la conversión del peróxido, es razonable eliminar del esquema cinético la acción de esta enzima⁽³⁶⁾.

La enzima catalasa E.C. 1.11.1.6 esta presente en animales, plantas y células bacterianas y tiene una de las más altas actividades moleculares. Tiene un peso molecular cercano a 250 000.

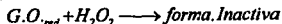
En la experimentación realizada uno de los puntos críticos⁽²⁰⁾ es el suponer que la mezcla de reacción contiene una cantidad de catalasa suficiente para la reacción simultánea de:



para ser considerada como instantánea en relación con la velocidad de reacción de:



Se ha establecido⁽³⁶⁾ que es susceptible de inactivación por peróxido la forma reducida de la enzima y que la magnitud de inactivación depende de la concentración de glucosa, ya que a altas concentraciones existe más enzima en su forma reducida, es decir:



1.3. CINÉTICA ENZIMÁTICA

A continuación se hace una corta reseña del mecanismo que siguen las enzimas para establecer el equilibrio químico que es el fundamento de la acción de las enzimas⁽²²⁾.

Las transformaciones químicas desde un punto de vista termodinámico, están gobernadas por el flujo de energía que esté implicado; siendo explicadas por la primera y segunda ley de la termodinámica.

En los sistemas bioquímicos la energía libre (ΔG) es el parámetro más útil y puede definirse como la energía disponible para ser utilizada en un trabajo; siendo el medio con el que un sistema llega al equilibrio cuando la temperatura es constante. Las reacciones químicas pasan a través de estados de transición que tienen alta energía libre, más que el sustrato y el producto de reacción.

Los sistemas que no están en equilibrio tienden a este estado en la dirección de un cambio de G negativo, cuando se alcanza el equilibrio no hay más cambios espontáneos y la energía libre es igual a cero; por lo que es necesario adicionar energía si se quiere modificar esta condición.

El hecho fundamental es que las enzimas disminuyen la energía de activación necesaria para que se lleven a cabo las reacciones.



Por otra parte, la velocidad de una reacción química es la cantidad de materia que se consume o se produce por unidad de tiempo y describe qué tan rápido cambian con el tiempo las concentraciones de los reaccionantes o los productos⁽¹⁰⁾ y generalmente se expresa de la siguiente forma (referido al componente A)⁽²²⁾:

$$r_A = \frac{\text{Moles de A que desaparecen}}{(\text{unidad de tiempo})(\text{unidad de volumen})}$$

La velocidad de reacción se puede determinar tanto para la desaparición de reactivos, como para la aparición de productos, todo depende de la metodología a seguir de acuerdo al tipo de reacción.

En los primeros experimentos realizados para la enzima invertasa, se encontró que la velocidad se incrementaba a concentraciones bajas de enzima y moderadas de sustrato, pero que se llegaba a un límite cuando la concentración de sustrato era elevada considerablemente con respecto a la de la enzima. A partir de entonces se maneja el hecho de que la enzima y el sustrato forman un complejo antes de la catálisis; observación muy útil para la representación y comprensión de la cinética enzimática.

Al graficar la velocidad inicial de reacción contra los valores de concentración de sustrato, se puede obtener⁽²²⁾:

$-V_{\text{máx}}$ o velocidad de saturación, que expresa la máxima velocidad de reacción para el sistema enzima - sustrato, cuando la concentración de la enzima se mantiene constante y la de sustrato se eleva considerablemente. En la representación gráfica la velocidad se acerca asintóticamente a un valor constante y la reacción es de orden cero con respecto al sustrato, siendo este punto en el que la enzima se encuentra saturada con el sustrato.



En 1913 Michaelis y Menten desarrollaron diversas ecuaciones de reacción para describir el mecanismo de acción de las enzimas, considerando que este consta de tres pasos elementales. Primero, la enzima E y el sustrato S se combinan en un paso bimolecular con una constante de velocidad k_1 , para formar el complejo enzima - sustrato ES. En el segundo paso se verifica una disociación que tiene lugar antes de que la catálisis haya ocurrido, regenerando la enzima y el sustrato y por último, después de que ocurrió la catálisis, se forma el producto P y se regenera la enzima.

Las especies E y ES generalmente no son fácilmente determinables, por lo que la ecuación de velocidad debe expresarse en función a especies medibles; es decir, de sustrato o producto.

De lo anteriormente mencionado se obtiene la siguiente ecuación general:

$$V = \frac{V_{máx} * S}{S + K_M}$$

Esta ecuación representa el género de las enzimas, pero como es conocido, existe una clasificación extensa de acuerdo al tipo de reacción que se lleva a cabo; por lo tanto se han derivado de ella una serie de ecuaciones que describen cada caso. Hoy en día son conocidos los mecanismos de reacción de la mayoría de las enzimas, por lo que conocer el tipo de ecuación que lo representa es importante en un estudio enzimático, para realizar el tratamiento de datos acorde a este comportamiento. En el anexo IV se encuentra más información sobre la ecuación y su deducción.

De acuerdo a lo anterior, el análisis de los resultados experimentales debe realizarse tomando como base la estadística, que se ha preocupado en determinar las metodologías adecuadas a seguir dependiendo del tipo de enzima y que se basa en las siguientes ideas:



Debido a que los datos tomados en las mediciones, no pueden ser evaluados directamente, debe tomarse en cuenta las desviaciones que se obtengan del comportamiento esperado⁽³⁴⁾.

La forma de la curva de reacción es importante en la determinación de actividades enzimáticas, ya que la actividad de una enzima está dada por la velocidad de la reacción que cataliza y en particular por la velocidad inicial⁽³⁴⁾.

Cuando se presenta una curvatura en la gráfica, esto significa que la velocidad cambia durante la reacción, decreciendo generalmente mientras la reacción progresa. Mientras la curvatura es más grande, es más difícil determinar la velocidad inicial.

Se obtienen valores aproximados prácticamente útiles de lecturas tomadas poco después de haberse iniciado la reacción⁽³⁴⁾, ya que la velocidad inicial típicamente persiste de 10 segundos a cientos⁽²⁶⁾. La duración de la velocidad inicial lineal depende de varios factores como la constante de equilibrio, la saturación fraccional de la enzima con el sustrato y producto, la capacidad del buffer y la concentración promedio del sustrato menos abundante con respecto a la enzima.

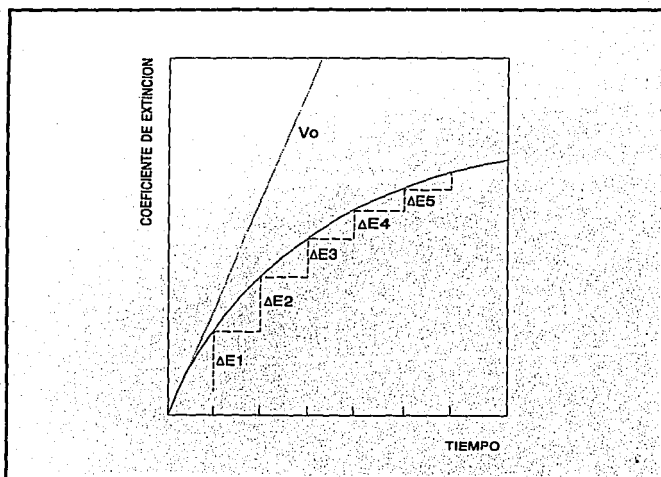
Para obtener la velocidad inicial, también se observa que esta persiste por un periodo de tiempo al cual la concentración del sustrato es el 10% del valor inicial⁽²⁶⁾.

Las lecturas tomadas pueden extrapolarse gráficamente a $t = 0$, a partir de los cuales para obtener valores de velocidad inicial, se dibuja una tangente a la curva en $t = 0$ ⁽³⁴⁾; ya que se obtendrán valores incorrectos del uso de la parte aparentemente lineal de la curva alrededor del punto de inflexión. La tangente al punto de inflexión tiene siempre menos pendiente que la tangente a la curva en el punto cero⁽¹³⁾.

Para obtener la tangente a la curva se usa un espejo que se coloca a través de la curva de reacción y se gira hasta que la imagen en el espejo forme una continuación perfecta de la curva. Posteriormente se dibuja una línea sobre el filo del espejo, que es perpendicular a la tangente ⁽³⁴⁾.

En la figura 6 se muestra gráficamente cómo se logra la determinación de la velocidad inicial V_0 en una curva no lineal.

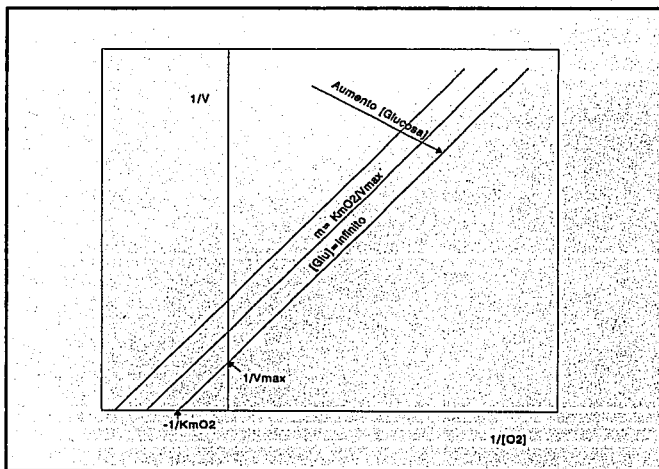
FIGURA 6
DETERMINACION DE LA VELOCIDAD INICIAL



Después de que se han establecido los valores de las velocidades iniciales, el siguiente paso es hacer una grafica preliminar en la forma reciproca, de esta manera se puede obtener una representación visual de cualquier tendencia y del grado de dispersión de los puntos; si este es demasiado grande se debe decidir en desechar el experimento e intentar otra vez⁽²⁵⁾.

El sistema Ping Pong Bi Bi (el mecanismo que lleva a cabo la enzima glucosa oxidasa) está representado gráficamente por la figura 7 en la que se tienen los recíprocos de la concentración de la velocidad inicial y de la concentración del sustrato de respuesta (en este caso oxígeno) a diferentes concentraciones de glucosa y es de la siguiente forma⁽²⁹⁾:

FIGURA 7
SISTEMA PING PONG BI BI



El objetivo de representar gráficamente los datos es establecer un método para determinar las constantes en ellos involucradas. Esto se logra con la construcción de dos gráficas, esencialmente:

-Gráfica primaria, que representa en el eje de las abscisas el inverso de la velocidad (datos obtenidos por el método del espejo) y en el eje de las ordenadas el inverso de la concentración de oxígeno; a las diferentes concentraciones de glucosa.

De la figura 8 que se muestra a continuación, se obtienen los siguientes valores:

$$m = \frac{Km_{O_2}}{V_{máx}}$$

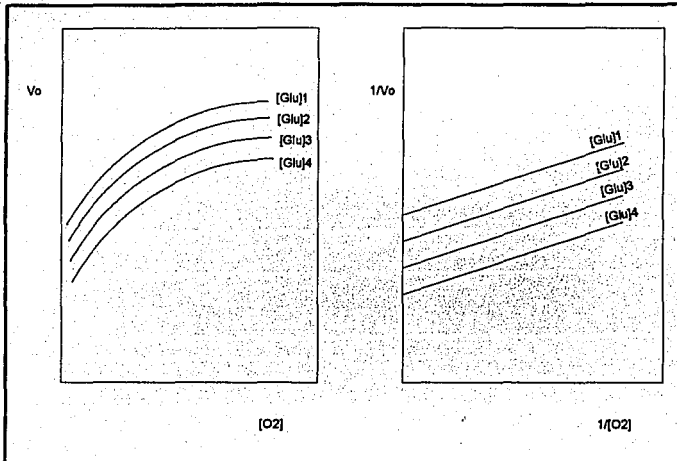
la intersección en el eje Y:

$$b = \left[\frac{1}{V_{máx}} + \left[\frac{1}{V_{máx}} \frac{Km_G}{C_G} \right] \right]$$

la intersección en el eje X:

$$b' = \left[\frac{-1}{Km_{O_2}} - \left[\frac{1}{Km_{O_2}} \frac{Km_G}{C_G} \right] \right]$$

FIGURA 8
GRAFICA PRIMARIA



-Gráfica secundaria, cuyos valores del eje de las abscisas son los de b obtenidos de la gráfica primaria y los del eje de las ordenadas son el inverso de la concentración de glucosa. De la figura 9 se obtiene lo siguiente:

$$m = \frac{Km_G}{V_{máx}}$$

la intersección en el eje Y:

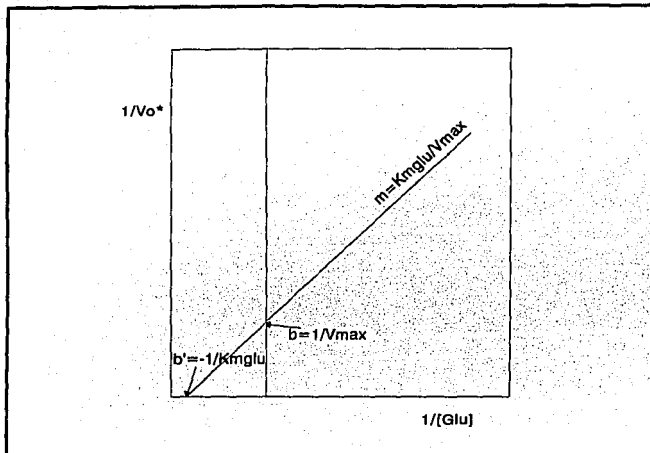
$$b = \frac{1}{V_{máx}}$$

la intersección en el eje X:

$$b' = \frac{-1}{Km_G}$$

FIGURA 9

GRAFICA SECUNDARIA



Como se mencionó las gráficas del inverso de la velocidad de consumo versus el inverso de la concentración de oxígeno (gráficas de Lineweaver-Burk) a diferentes concentraciones de glucosa dan una serie de líneas paralelas que indican la dependencia de la velocidad en ambos sustratos así como el mecanismo Ping Pong Bi Bi (movilidad de un estado totalmente oxidado a una forma totalmente reducida y retorno al estado oxidado en un ciclo catalítico⁽²⁴⁾). El mecanismo en el que el producto se libera por la adición de dos sustratos es llamado Ping Pong⁽²⁹⁾; además pueden ser referidas por 3 constantes⁽¹²⁾:

- La velocidad de ambos sustratos a concentraciones infinitas ($V_{\text{máx}}$).
- La concentración que cada sustrato requiere para dar la mitad de su velocidad máxima en presencia de una concentración infinita del otro ($K_{m\text{Glu}}$ y $K_{m\text{Ox}}$).



La constante de Michaelis (K_m) indica las relaciones de afinidad entre el sustrato y la enzima; una K_m elevada implica la necesidad de una alta concentración de sustrato que, al combinarse con una enzima, produzca la mitad de la velocidad máxima, es decir, la afinidad de enzima y sustrato es pobre; por el contrario, si la concentración es muy pequeña (K_m pequeña), quiere decir que el sustrato tiene una gran afinidad por la enzima⁽¹⁷⁾.

Este concepto de Michaelis es el que se empleará para explicar la actividad enzimática de la glucosa oxidasa.

1.4. SOLUCIONES BUFFER O AMORTIGUADORAS.

En estudios clínicos la importancia de las soluciones buffer radica esencialmente en la función intrínseca de resistir los cambios de pH cuando ciertas cantidades de base ó ácido son añadidas al medio.

Aunado a lo anterior se puede mencionar que la mayoría de las enzimas son susceptibles a cambios de pH en el medio, siendo un factor a saber y controlar en lo posible tanto su pH óptimo como el pH de trabajo y el obtenido después de haber llevado a cabo una reacción; ya que tanto los intermediarios como los productos son fuentes de variación en el.

El pH óptimo no sólo depende de la naturaleza y de la fuerza iónica del buffer, ya que generalmente varía con la temperatura y con la concentración de sustrato⁽³⁴⁾.

La selección del buffer depende del pH a manejar. Debe tenerse cuidado en la selección de los buffers, ya que no deben tener interacción directa con la enzima o los sustratos⁽²⁵⁾.



Para la enzima glucosa oxidasa proveniente de *Aspergillus niger* el pH óptimo reportado es de 5,6^(1,3,12,27,38) la velocidad de consumo no se ve afectada por las variaciones de concentraciones entre 0.03 y 0.25M de buffers de acetato y fosfato⁽¹⁾; por lo que para la realización de los experimentos posteriores se tomó el rango de 5.60 a 5.66 para la obtención de las soluciones buffer.

1.5. TRANSFERENCIA DE OXIGENO

En un fermentador, el oxígeno de las burbujas de aire debe disolverse para poder transportarse a las células microbianas. De acuerdo a Reuss et al (1974)⁽²⁾ se han establecido las resistencias individuales a la transferencia de oxígeno a través de películas estacionarias de fluido de acuerdo a:

-Difusión desde el centro de la burbuja gaseosa hasta la película gaseosa en la región interna de la burbuja.

-Difusión a través de la película gaseosa.

-Tranporte a través de la interfase gas-líquido.

-Difusión a través de la película líquida del lado de la fase líquida.

-Transporte a través del líquido hacia la membrana celular.

-Difusión a través de la película líquida que rodea a la membrana celular.

-Transporte a través de la membrana celular.

-Resistencias a la reacción dentro de la célula.

Durante un proceso de fermentación el oxígeno atraviesa la interfase gas-líquido que a pesar de estar sometida a condiciones turbulentas, presenta una película adyacente y delgada de fluido, en flujo laminar. En esa película el mecanismo de transferencia de masa es la difusión molecular, que también está presente en los remolinos característicos del flujo turbulento.



De acuerdo a lo anterior, es común describir la velocidad de transferencia de masa como una combinación de película laminar y zona de turbulencia. El recurso empleado para describir estas situaciones es el coeficiente de transferencia de masa $K'a$, ya que incluye los efectos que son el resultado de los procesos de difusión molecular y turbulencia.

Según Blenke (1979)⁽²⁾ tanto la difusión desde el centro de la burbuja gaseosa hacia la película gaseosa y la difusión a través de esta última, pueden considerarse despreciables debido a la gran turbulencia que existe en la fase gaseosa; por tanto:

$$C_G = C_G$$

C_G = Concentración del oxígeno en la fase gaseosa.

C_G = Concentración del oxígeno en la película gaseosa.

Por otra parte, la absorción de oxígeno a través de la interfase gas-líquido (que en este estudio es la parte central; ya que no se tiene un microorganismo en el sistema), puede describirse suponiendo un estado de equilibrio constante de acuerdo a la ley de Henry⁽²⁾:

$$C_0^+ = \frac{C_G}{He} = \frac{C_G}{He}$$

C_0^+ = Concentración de oxígeno en la interfase gas-líquido.

He = Constante de Henry.

En donde He proviene de la ley de Henry la cual enuncia que a temperatura constante la cantidad de gas que puede disolverse en una unidad de volumen de un líquido es proporcional a la presión parcial del gas sobre el líquido ó:

$$c = H_g p$$

En donde:

c = Concentración del gas en el líquido.

He = Constante de Henry, que depende de la temperatura y las especies presentes.

p = Presión parcial.



En este trabajo no se toman en cuenta cuestiones relacionadas con microorganismos (mencionadas anteriormente para fermentadores), ya que se trata de averiguar si empleando la glucosa oxidasa se pueden analizar problemas de transferencia de oxígeno al medio.

De acuerdo a Linek⁽²⁰⁾ el uso de glucosa oxidasa ha sido recomendado para estimar la velocidad de transferencia de oxígeno en caldos de fermentación, debido a que la glucosa disuelta sufre una oxidación enzimática por el oxígeno absorbido.

La ecuación de velocidad para el oxígeno transferido en un líquido bajo condiciones de estado estacionario es:

$$N = K_L a (C_o^* - C_o) = \frac{v}{2}$$

En donde:

N = Velocidad de absorción de oxígeno global ó total [mmol/l h].

$K_L a$ = Coeficiente volumétrico de transferencia de masa.

C_o^* = Concentración de oxígeno en la fase de unión en equilibrio con el gas emergente del fermentador [expresada como 100% de saturación].

C_o = Concentración de oxígeno en el medio [expresada como porcentaje de saturación en referencia al medio saturado al 100%].

$\frac{v}{2}$ = Velocidad de consumo de oxígeno en la reacción enzimática simultánea.

Esta ecuación establece que la velocidad de transferencia de oxígeno del gas al líquido es igual a la velocidad de consumo de oxígeno por la reacción enzimática. Por lo tanto para calcular $K_L a$ es necesario conocer $\frac{v}{2}$ y para ello es necesario conocer las constantes cinéticas de la reacción enzimática.

La ecuación de velocidad considerando la aproximación de Haldane de estado pseudoestacionario (PSS)⁽²⁰⁾ es:

$$V = \frac{dc_L}{dt} = -\frac{dc_O}{dt} = -2 \frac{dc_O}{dt} = \frac{C_E K_{kat}}{1 + \frac{K_{m_O}}{C_O} + \frac{K_{m_G}}{C_G}}$$

En donde:

C_E = concentración de enzima expresado en términos de la concentración molar del FAD reducible.

Uniendo las ecuaciones anteriores se muestra la expresión para el cálculo de $K_f a$ incluyendo un valor estacionario de la saturación relativa de carga de líquido del fermentador por oxígeno (H)⁽²⁰⁾:

$$K_f a = \frac{V}{2(C_O^* - C_O)} = \frac{C_E}{2(1-H)C_O^* + 1 + \frac{K_{m_O}}{(C_O^* H)} + \frac{K_{m_G}}{C_G}}$$

Como ya se mencionó para poder establecer el coeficiente de transferencia de oxígeno, debe medirse la cantidad de oxígeno disuelto en el medio. Esto puede lograrse por métodos tales como⁽²⁾:

- Químico, para determinaciones absolutas del contenido de oxígeno en los líquidos y se emplea como referencia para los métodos directos de medición. Las desventajas de este método son que requiere mucho tiempo y cuidado en el muestreo especialmente cuando la concentración es baja y se vé interferido por solutos presentes en las aguas y caldos de fermentación.

- De tubo, se basa en el mismo principio del electrodo cubierto con membrana.



- Manométrico y volumétrico, basados en la absorción de oxígeno por fósforo o pirogalol. El método manométrico utilizando el aparato Warburg se basa en el principio de que a temperatura y volumen constante de gas, cualquier cambio en la cantidad de este puede medirse por cambios en su presión. Para medir el curso de una reacción, el fluido del manómetro se ajusta a 250 mm y si se conoce el volumen del gas del frasco (V_g), el volumen del fluido en el frasco (V_f), la temperatura de operación, el gas intercambiado y la densidad del fluido del manómetro; es posible calcular la cantidad de gas usado^(9,35).

- Aproximaciones físicas, según las propiedades paramagnéticas del oxígeno molecular.

- Determinación espectrofotométrica cuando se trata de reacciones de oxidación y reducción. Esto se logra mediante espectrofotómetros de modelos recientes que cuentan con programas específicos para cinéticas de este tipo; el inconveniente es el hecho de que no se puede manipular la concentración de oxígeno fácilmente.

- Electroquímico, cuyo principio básico es la reducción electroquímica del oxígeno no combinado a un potencial constante, utilizando la corriente como una medida de la cantidad de oxígeno involucrada, por unidad de tiempo. La base de las mediciones polarográficas es la reducción del oxígeno en el electrodo negativo⁽²⁾.

En los primeros electrodos construidos el material proteínico presente en el medio tenía la tendencia a depositarse en la superficie activa del electrodo; interfiriendo con la difusión estacionaria del oxígeno al electrodo. Este problema se evitó proveyendo al electrodo con una membrana permeable a las moléculas de oxígeno, pero no a otras moléculas⁽³⁹⁾.

La membrana tiene una función importante, ya que además de actuar como una barrera, establece la velocidad de difusión; minimizando el efecto de variaciones de viscosidad en el medio⁽³⁹⁾.



A los electrodos Leland Clark en 1953 les adicionó la membrana, para eliminar esas dificultades con respecto a la variación de la corriente residual y contaminación de la superficie del electrodo⁽²⁾.

A continuación se explicará más sobre este método en especial; que fué el empleado en este trabajo.

1.5.1. ELECTRODO DE OXIGENO

Una medición de oxígeno disuelto se denomina indirecta porque se lleva a cabo en sistemas donde no se está efectuando una fermentación, ya que los valores obtenidos indican un orden de magnitud y se emplean para hacer comparaciones entre diferentes reactores que operan en condiciones similares⁽²⁾.

Los electrodos cubiertos con una membrana pueden clasificarse en potenciométricos y amperométricos. En los primeros, el potencial desarrollado en el electrodo es el que relaciona a la concentración de las especies a las cuales responde el electrodo. En los amperométricos o galvánicos la corriente es el parámetro que relaciona la concentración. En estos electrodos las especies analizadas se consumen no siendo así en los potenciométricos⁽²⁾.

Los metales de los electrodos no son necesariamente metales nobles, los hay de plomo-plata y aluminio-platino.

El electrodo de oxígeno se basa en los siguientes principios⁽³⁹⁾:

La corriente eléctrica generada por el electrodo de oxígeno varía en proporción directa al número de moléculas de oxígeno disuelto en solución.

De acuerdo a la ley de Henry, la corriente generada por el electrodo puede usarse para obtener la presión parcial del oxígeno (PO_2); ya que existe una relación lineal entre la presión del oxígeno y el número de moléculas en solución cuando la temperatura es constante.

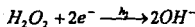
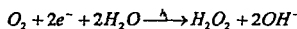


Básicamente el electrodo consiste de un cátodo manufacturado de un metal semimoble, usualmente platino, oro ó plata y un ánodo de referencia de cloruro de plata-plata.

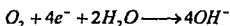
Un voltaje polarizante y constante se aplica al cátodo y en presencia de moléculas de oxígeno se genera una corriente extra que es independiente al voltaje polarizante. Esta corriente extra se deriva de la difusión del oxígeno a la superficie del electrodo⁽³⁹⁾.

Por lo tanto la señal que aparece representa el flujo de electrones que sale del electrodo que a su vez es función del flujo de moléculas de oxígeno a través de la membrana del electrodo⁽²⁾.

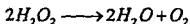
En el cátodo se llevan a cabo las siguientes reacciones:



Siendo representada la ecuación total:



Cuando los electrodos no son contruidos con los materiales adecuados y no se tiene el suministro de $4e^-$ necesarios para llevar a cabo la reacción; entonces se puede presentar el siguiente caso:



Lo que provoca que se cuantifique también esta molécula extra de oxígeno y que el electrolito acumule peróxido.

Es importante saber que la sensibilidad del electrodo es afectada por las características de la membrana, el tamaño del cátodo de platino y la temperatura⁽³⁹⁾.



La condición de estado estacionario que se lleva a cabo en el electrodo se explica en la continuación: Cuando una película fina de solución se introduce a través de la superficie de la membrana del electrodo de oxígeno una difusión unidimensional en estado estacionario se establece después de cierto tiempo. Si no se considera la resistencia del gas, se puede suponer que el líquido en la interface gas-líquido está saturado con oxígeno y puede considerarse como una fuente de difusión de oxígeno.

En la superficie del cátodo, el oxígeno continuamente es reemplazado en reacciones electroquímicas rápidas; siendo esta velocidad de consumo mucho mayor que la velocidad de difusión, de ahí que la presión parcial de oxígeno en la superficie del cátodo puede considerarse nula⁽¹⁵⁾.

En distintos trabajos^(15,18,21) se reportan los comportamientos y respuestas que se obtienen al emplear electrodos de oxígeno. En el trabajo que nos ocupa basta mencionar que se considera el estado estacionario ya que el comportamiento de la presión parcial del oxígeno en la membrana es lineal⁽¹⁵⁾.

El estudio de transferencia de masa en electrodos de oxígeno es interesante ya que involucra la determinación de coeficientes de difusión que no pueden obtenerse directamente de un análisis en estado estacionario, sino además de la adaptación del estado no-estacionario⁽¹⁵⁾; siendo el fenómeno la base a partir de la cual se obtienen los datos a analizar de trabajos como este.



CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

A continuación se presenta un listado de instrumentos, materiales y sustancias empleadas en toda la experimentación, haciendo énfasis sobre sus características relevantes en cada etapa subsecuente.

- 1.- Tanque o recipiente de reacción de 35 ml de capacidad.
- 2.- Electrodo polarográfico INGOLD INC.
- 3.- Amplificador 170 INGOLD INC.
- 4.- Interfase DATALOGGER M5000 ECO.
- 5.- Plato magnético THERMOLYNE NUOVA II.
- 6.- Agitador magnético de 2 cm.
- 7.- Válvula de tres vías.
- 8.- Termostato y termómetro.
- 9.- Lámpara estroboscópica STROBETTE AMETEK 964.
- 10.- Espectrofotómetro BECKMAN DU-65, programa PEAK PICK y celda de cuarzo estandar de 10 mm.
- 11.- Jeringa Hamilton HP.
- 12.- Glucosa Oxidasa SP 358 NOVO ENZYMES (BIOTECSA).
- 13.- Oxígeno extraseco INFRA 99.5 %.
- 14.- Nitrógeno cromatográfico INFRA 99.99%.
- 15.- Electrolito.
- 16.- Buffer de fosfatos 0.1 M.
- 17.- Buffer de acetatos 0.05 M.

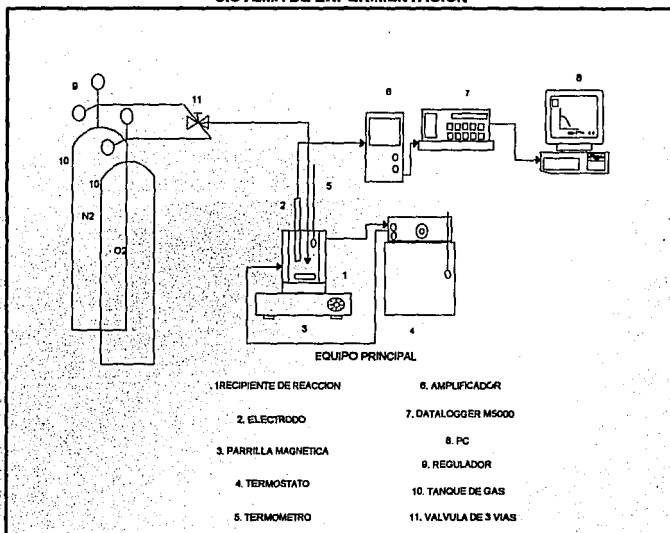


2.1. SISTEMA DE EXPERIMENTACION

El sistema de experimentación o montaje depende de varios factores, como son el método que se empleará para cuantificar la respuesta, la velocidad para capturar los datos que se obtienen, la sensibilidad y el control que se desee tener sobre variables secundarias, entre otras. En este trabajo se empleó el sistema de tanque agitado tipo batch, como puede verse en la figura 10 :

FIGURA 10

SISTEMA DE EXPERIMENTACION

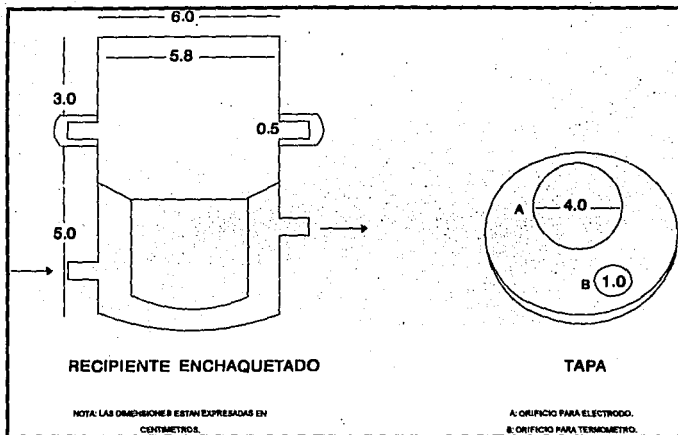




El tanque o recipiente de reacción empleado tiene un volumen de $3.5 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3$ y se muestra en la figura 11:

FIGURA 11

RECIPIENTE DE REACCION



La capacidad máxima para el recipiente es de 35 ml, contenidos en la zona de enchaquetamiento. En general en los experimentos se emplearon volúmenes menores a este, para asegurar que con la agitación y burbujeo no se provocara la salida del líquido fuera de la zona de enchaquetamiento.

La agitación se realizó con un plato magnético y un agitador de 2cm de largo, que provocaba la formación de un vórtice mediano adecuado; ya que otros agitadores más grandes no permiten que el electrodo tenga buen contacto con el líquido.



La velocidad de agitación empleada durante la experimentación fué de 1200 rpm, que fué determinada con la lámpara estroboscópica. Se usó una velocidad de agitación elevada para garantizar la homogenización de la mezcla de reacción y para minimizar el efecto de difusión de oxígeno disuelto que existe en la película líquida adyacente a la membrana del electrodo.

La válvula de tres vías permite un rápido acceso de los gases empleados (oxígeno y nitrógeno), teniendo en cuenta que la distancia de la válvula al recipiente de reacción es mínima; para no introducir errores en la lectura del sensor al reemplazar un gas por otro; es decir el tiempo muerto existente durante el intercambio de los gases.

La interfase recibe la señal del amplificador de lectura del electrodo y junto con una PC, permiten realizar las siguientes acciones⁽⁸⁾:

- Capturar datos cada segundo (valor mínimo) de la señal enviada por el amplificador.
- Listar, imprimir y grabar los datos obtenidos.
- Trazar gráficas de los datos obtenidos hasta cierto tiempo deseado.
- Configurar la presentación de los datos. Mediante esta opción los valores de m y b deben introducirse, la interfase afecta la señal que recibe con ellos; es decir, en este caso se le introdujo un valor de $m= 1.0$ y $b= 0.0$, lo que quiere decir que cada unidad mandada por el amplificador corresponde a 1mV en la interfase.

Como puede observarse en el mecanismo de cinética de la glucosa oxidasa, la concentración de glucosa puede medirse por el monitoreo de la concentración de oxígeno consumido, de peróxido de hidrógeno producido ó la medición de pH (observando la producción de ácido glucónico)⁽²⁴⁾.

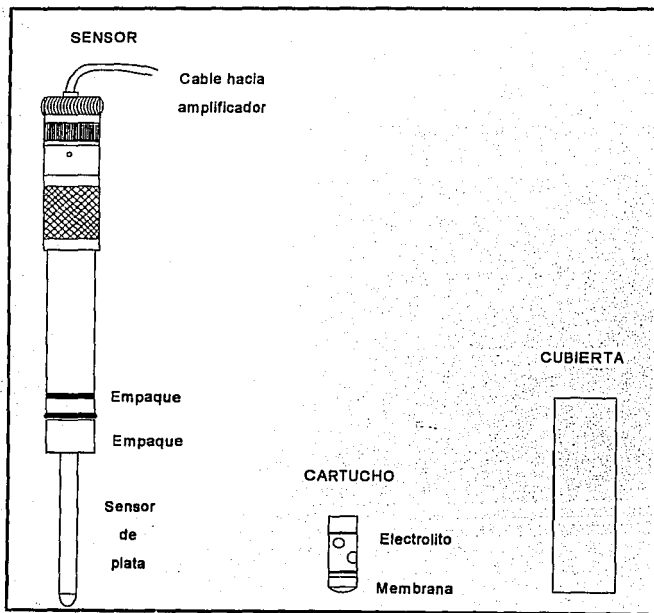


En este caso mediante el uso del electrodo de oxígeno se verificó la función redox de la enzima glucosa oxidasa. Debido a este hecho, debe realizarse la calibración del electrodo, procedimiento que a continuación se explica:

2.2. CALIBRACION DEL ELECTRODO DE OXIGENO

La figura 12 muestra las partes componentes del electrodo polarográfico empleado en la experimentación.

FIGURA 12
ELECTRODO DE OXIGENO



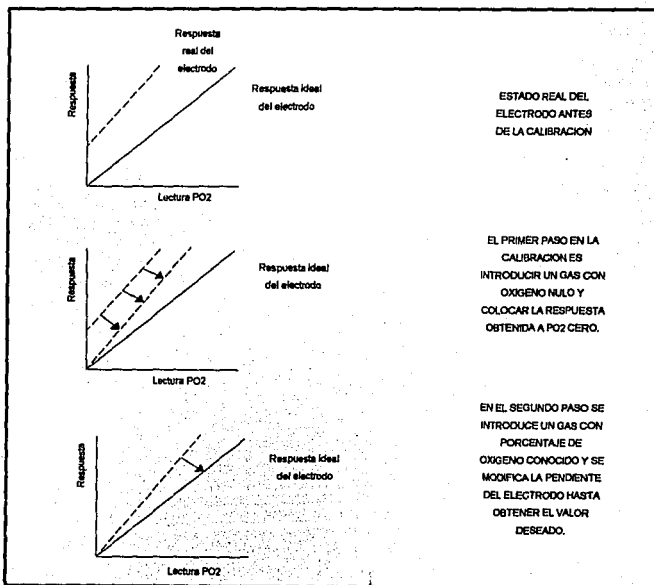


El electrodo debe ser calibrado antes de emplearse en mediciones; requiriéndose para este fin un amplificador de salidas del electrodo.

La calibración puede realizarse de diversas formas (gas con 0% de O_2 y mezcla de gas con 21% de O_2 ó gas con 0% de O_2 y gas con 100% de O_2); la elección depende de la escala de concentraciones de oxígeno que desee manejarse; es decir de 0 a 21% ó de 0 a 100%. Mediante las gráficas representadas en la figura 13 se muestran los ajustes que se verifican en la respuesta del sensor al realizar la calibración ⁽³⁹⁾.

FIGURA 13

PASOS DE CALIBRACION DEL ELECTRODO DE OXIGENO



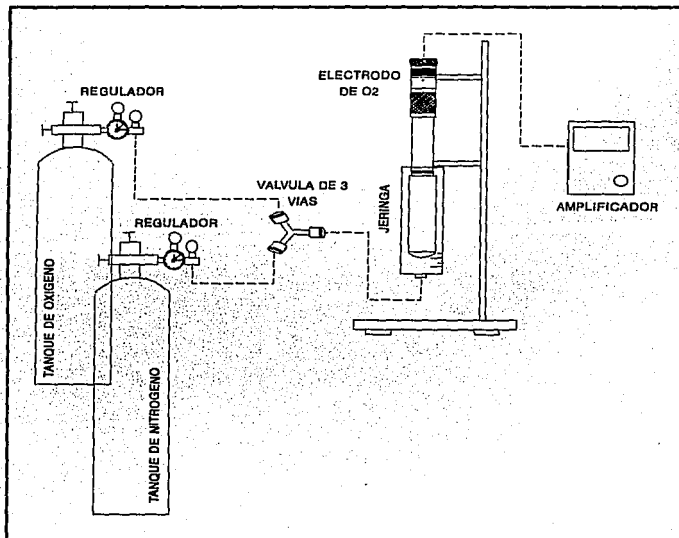


En este trabajo se empleó el segundo sistema de calibración para el electrodo polarográfico de la siguiente manera:

Se montó un sistema de calibración en gas, como puede verse en la figura 14.

FIGURA 14

SISTEMA DE CALIBRACION DEL ELECTRODO EN GAS



Debe verificarse que tanto el sensor como los cables estén secos; ya que de no ser así las lecturas obtenidas no son correctas⁽¹⁶⁾.

En primer lugar se puso en contacto con nitrógeno para llevar a cabo el ajuste a cero por ciento de oxígeno.



Después de inundar el sensor por cierto tiempo (no se pudo medir el flujo debido a los valores tan pequeños, no detectables por el instrumento a mano), se observó que la lectura era estable y muy cercana a cero; por lo que se ajustó a valores tales como 0.2 y 0.3 % de oxígeno en el amplificador. Estos valores representan la corriente residual del electrodo. Es decir, no es posible que haya 0.0% exacto.

Posteriormente por medio de la válvula de 3 vías se introdujo oxígeno para realizar el ajuste a 100%; al igual que para el nitrógeno, se dejó estabilizar la lectura y se ajustó a valores de 99.8 a 100 %.

Estos pasos se realizaron varias veces hasta obtener los valores deseados de 0% y 100%.

En este momento es importante evaluar la velocidad de respuesta del sensor; ya que si ha permanecido almacenado por un tiempo importante, debe cambiarse el electrolito así como verificar el estado de los empaques y reemplazarlos, de ser necesario.

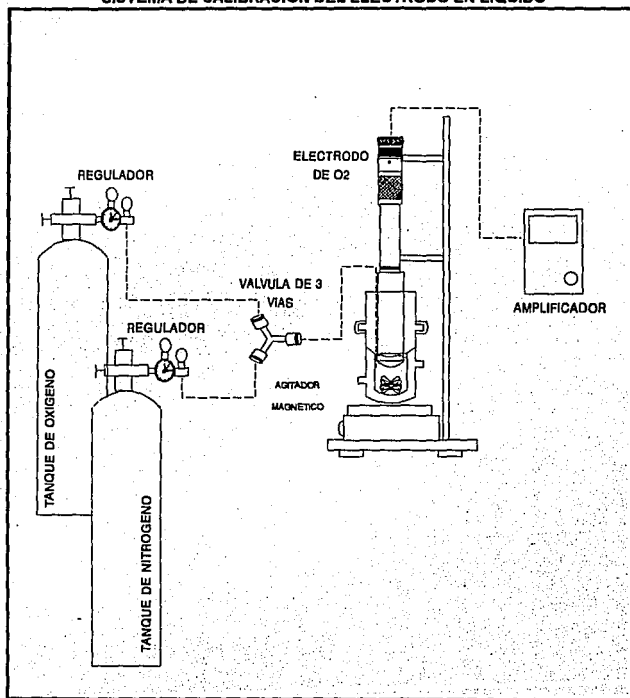
Es importante realizar la calibración posterior en líquido; ya que en este medio se verifica la reacción y evidentemente no se tienen los mismos valores en la saturación para el gas que para el líquido, siendo este valor último el determinante en los cálculos y gráficos posteriores.



Esta sistema de calibración está representado por la figura 15:

FIGURA 15

SISTEMA DE CALIBRACION DEL ELECTRODO EN LIQUIDO





Estas calibraciones se realizaron cada vez que un experimento de cinética se iba a llevar a cabo; por lo tanto se verificaron las mismas condiciones de temperatura de 25°C (en el líquido) y velocidad de agitación de 1200 rpm.

Al igual que en gas, se ajustaron las lecturas a valores muy cercanos a 0% y a 100% de oxígeno en fase líquida.

2.3 PROPIEDADES DE LA ENZIMA G.O.

2.3.1. PROTEINA

Se realizó la determinación de la cantidad de proteína presente en el liofilizado de glucosa oxidasa (proporcionada por BIOTECSA), ya que da una idea de la pureza del preparado comercialmente disponible; aun con la reserva de que no necesariamente toda esta proteína es la correspondiente a la enzima de interés, ya que se sabe que existen enzimas 'contaminantes' tales como la invertasa y catalasa entre otras.

Para llevar a cabo este objetivo se empleó el método de Lowry o de reactivo Folin-Ciocalteu, que se expone en el anexo 1.

2.3.2. CONCENTRACION DE FAD ACTIVO

La concentración de las soluciones de enzima se determinó espectrofotométricamente; que de acuerdo a la literatura deben prepararse soluciones que contengan de 1 a 10 μmol de FAD unido en acetato de potasio 0.01M a pH 5.5⁽³⁷⁾.

Las muestras a analizar fueron las siguientes:

- 1.- Solución 1 $\text{mg}_{enzima}/\text{ml}$ sin reacción.
- 2.- Solución 1 $\text{mg}_{enzima}/\text{ml}$ con reacción.



3.- Solución 2 mg_{enzima}/ml sin reacción.

4.- Solución 2 mg_{enzima}/ml con reacción.

La medición de absorbancia se hizo en la solución de enzima sin y con reacción, para poder observar el pico máximo a partir del cual se hizo el cálculo de la concentración de FAD activo.

Las mediciones de absorbancia se realizaron en el espectrofotómetro de la siguiente forma:

Las soluciones de enzima se mantuvieron bajo burbujeo con oxígeno por 20 min; asegurando con esto el estado oxidado del FAD.

Se transfirieron 2 ml de la solución de enzima a una celda de cuarzo estándar de 10 mm de altura de compartimiento para la muestra, realizando la calibración del aparato con agua destilada.

Se realizó un barrido de 200 a 600 nm en el programa PEAK PICK del espectrofotómetro, cuya función es la de detectar los puntos máximos en el rango de longitud de onda seleccionado. El programa se basa en la primera derivada de 5 lecturas continuas, de las cuales si el signo cambia de negativo a positivo se determina un punto máximo, que posteriormente es comparado con otros puntos máximos; hasta que se obtienen los 5 picos más altos en el último barrido tomado por el instrumento.

Posteriormente se les añadió 20 μ l de solución de glucosa 1.0M por medio de una jeringa Hamilton, agitando vigorosamente para un buen mezclado, se tapó la celda realizandose el barrido para la muestra con reacción.

La solución de glucosa empleada se dejó a temperatura ambiente desde un día antes de la prueba, para que se diera el equilibrio entre las formas anoméricas α y β ; además se burbujeo con nitrógeno antes de la prueba; para extraer el oxígeno disuelto.



Se hicieron 3 barridos para la misma muestra con espaciado de 1 *min* entre cada una para verificar la progresión de la reacción.

2.3.3. ACTIVIDAD DE GLUCOSA OXIDASA

El sistema de experimentación empleado es el mismo que se emplea en la cinética y está representado en la figura 10.

Al comenzar la prueba se verificó que la temperatura del agua en el baño fuera 25.5°C, ya que al asegurar esto, el recipiente de reacción tuvo una temperatura de 25°C.

En el recipiente de reacción se colocaron 28.8 *ml* de buffer de fosfatos 0.1M, en donde se resuspendieron 0.0288 *g* de liofilizado enzimático, manteniéndolo en agitación a 1200 *rpm* hasta su total incorporación.

Se burbujeó oxígeno por 10 *min* aproximadamente, hasta obtener nuevamente el 100% de saturación como se realizó en la calibración del sensor. Al transcurrir el tiempo para la saturación, la solución ya tenía la temperatura de 25°C, que se mantuvo a lo largo de la prueba.

Se suspendió el burbujeo y se dejaron transcurrir aproximadamente 5 *s*, para asegurar que la lectura se sostuviera y que el valor de 100% fuera real (oxígeno disuelto) y no el debido a las burbujas de oxígeno que tienen contacto con el sensor.

La solución de glucosa se preparó un día antes y se dejó a temperatura ambiente para asegurar el equilibrio de las dos formas anómericas⁽³⁾, al igual que para la determinación de FAD activo.



La concentración de solución de glucosa empleada fué $1.6M$, ya que al agregar 3.2 ml de ella en un volumen final de 32 ml , se obtiene una concentración de $0.16M$; siendo este valor el de saturación para la enzima glucosa oxidasa⁽³⁾, cumpliendo tanto para el oxígeno como para la glucosa con la condición de saturación, necesaria para evaluar la máxima velocidad de reacción.

Se dejó correr la prueba hasta que la concentración de oxígeno ya no presentaba mucho cambio con el tiempo.

2.3.4. ACTIVIDAD DE CATALASA

Se emplea el mismo sistema de experimentación que para la determinación de glucosa oxidasa.

Se llevó a cabo el experimento a $25^{\circ}C$, controlandola durante la duración de este.

En 27 ml de buffer de acetatos $0.05M$ pH 5.4 , se suspendieron muestras de 0.027 g cada una del preparado de glucosa oxidasa.

Posteriormente se burbujeo la solución con nitrógeno, para no tener lectura de oxígeno al comienzo de la reacción.

Se provocó el inicio de la reacción con 1 ml de solución de peróxido de hidrógeno $0.1M$, capturando los datos de desprendimiento de oxígeno con la interfase.

Al agregar el sustrato se advierte el incremento del oxígeno presente en la mezcla, hasta que se obtiene un punto máximo y después una etapa de disminución en la lectura.



2.3.6. CONSTANTES CINÉTICAS EN SOLUCIÓN BUFFER

Una vez que se conocieron las propiedades más relevantes de la enzima a emplear tomando como guía lo anteriormente mencionado, se verificó una vez más que los aparatos estuviesen calibrados y se realizó una serie experimental que se muestra en la siguiente tabla:

TABLA 4
NIVELES DE VARIACIÓN EXPERIMENTAL.

GLUCOSA (M)	OXÍGENO (%)
0.025	25, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 100
0.05	25, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 100
0.1	25, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 100
0.2	25, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 100

Los experimentos se realizaron por duplicado en cada una de las concentraciones referidas anteriormente.

Estos valores de concentración de glucosa fueron establecidos con base en tres hechos:

1. Las condiciones reportadas en la literatura por Gibson⁽³⁾.
2. Las consideraciones para el diseño experimental y evaluación de resultados⁽⁵⁾ por métodos estadísticos.
3. El cumplimiento del estado pseudoestacionario^(19,20) ó condición de Haldane.



A continuación se explica de forma más detallada cada punto antes mencionado:

Gibson realizó investigaciones sobre glucosa oxidasa con el método "stopped flow" a diferentes temperaturas para glucosa como sustrato, además de otros azúcares.

Los valores reportados, están de acuerdo con los obtenidos recientemente; además se trata de valores promedio de experimentos concordantes⁽¹²⁾.

De acuerdo al diseño de experimentos para enzimas, una vez que se ha establecido el método de medición de velocidades, debe elegirse la concentración de sustrato con base en la amplitud del intervalo de concentraciones a emplear, además del espaciado entre los puntos y el número de determinaciones que se llevarán a cabo⁽⁴⁾.

Un espaciado de puntos debe incluir niveles de sustrato de 0.2K a 5K, tales que producirán velocidades que estarán en el intervalo de $\frac{1}{6}v$ a $\frac{5}{6}v$ ⁽⁴⁾. Haciendo cálculos con los datos, se pudo ver que lo anteriormente mencionado es una buena guía, si se tiene idea del valor de las constantes cinéticas.

La suposición de pseudo estado estacionario (PSS) fué propuesta por Briggs y Haldane⁽²⁰⁾ y es válida cuando:

-La concentración inicial de glucosa y de oxígeno es considerablemente más grande que la de enzima.

El estado estacionario se refiere a que la concentración de los reactantes y productos se mantienen constantes en la mezcla de reacción, además de la concentración de la enzima activa.

De la suposición de Haldane se obtuvo el siguiente criterio:

- La concentración de la enzima debe ser 250 veces la concentración de la glucosa.
- La concentración de la enzima debe ser 50 veces la concentración del oxígeno.



Considerando que la concentración de enzima varía de $4 \cdot 10^{-9}$ a $8 \cdot 10^{-8} M$ (12,19,20), se manejó como objetivo la concentración de $4.778 \cdot 10^{-8} M$ sin considerar aún la concentración 'real' obtenida de la determinación espectrofotométrica del FAD activo.

Se preparó una solución de enzima $2.389 \cdot 10^{-4} M$, para de ella tomar $2.5 \mu l$ y llevarla a un volumen final de $25 ml$ y por tanto una concentración de enzima de $2.389 \cdot 10^{-8} M$, que finalmente da una concentración de $1.1709 \cdot 10^{-8} M$ de FAD activo. (ver determinación espectrofotométrica), página 51.

Para realizar la experimentación se empleo el sistema de la figura 10. página 43.

Al igual que para las otras determinaciones, las soluciones de glucosa empleadas se prepararon 24 horas antes dejándose a temperatura ambiente para permitir la mutarotación del azúcar en sus formas anoméricas α y β (3), para obtener el equilibrio(20):



Este es un punto fundamental en la experimentación realizada, ya que se considera que la mutarotación se lleva a cabo a una velocidad lo suficientemente rápida, para que la concentración del anómero β de la D-glucosa sea reemplazada en las ecuaciones cinéticas por la concentración total de glucosa(19,20).

Es importante mencionar, que se realizó un experimento previo con el objetivo de determinar cuál de las dos opciones siguientes era la más adecuada:

1. Al sustrato añadirle la enzima.
2. A la enzima añadirle el sustrato.



Al realizar el primer experimento se observó que el sistema se comporta como si no existiese reacción alguna, no siendo así cuando la enzima a la que se ha burbujeado con oxígeno por un tiempo considerable comparado con el tiempo que se toma para dar la velocidad inicial, se encuentra totalmente oxidada y lista para llevar a cabo la reacción; que se observa inmediatamente el consumo del sustrato.

Una vez especificado lo anterior, a continuación se explica en forma general como se llevo a cabo la serie experimental para la determinación de las constantes cinéticas:

La lectura del electrodo se verificó en el aire, así como la temperatura del baño a 25.5°C.

Se colocaron 22.5 ml del buffer de fosfatos 0.1M en el recipiente de reacción, manteniéndolo en agitación a 1200 rpm (al mantener este valor, se pretendió tener una distribución uniforme de los componentes de la reacción); mientras se introdujo nitrógeno.

El burbujeo continuó hasta obtener valores cercanos a cero, donde se retiró el flujo del gas hacia la solución de glucosa para evitar que al introducirla en la reacción pudiera tener oxígeno disuelto y dar una lectura falsa.

La interfase se puso en ceros para comenzar a capturar datos a partir de este punto. Se inyectaron 2.5 μ l de solución de enzima de concentración conocida, por medio de la jeringa Hamilton. El medio se dejó en agitación por 20 s aproximadamente.

El oxígeno se introdujo en el recipiente por medio de la válvula de 3 vías y se controló su flujo con el regulador del tanque. El burbujeo se realizó poco a poco hasta que se alcanzaron los porcentajes de saturación deseados.

Es importante mencionar que el valor de concentración deseado se sostuvo por algunos segundos, para poder asegurar así que la lectura no era incorrecta.



Una vez que se obtuvo el valor deseado en la pantalla del amplificador de oxígeno, se suspendió el burbujeo de oxígeno y se añadieron 2.5 ml de la solución de glucosa; iniciando con esto la reacción.

Para este tiempo, la solución de enzima ya contaba con la temperatura de reacción deseada ó preincubación para permitir el equilibrio térmico, como se recomienda en la literatura⁽²⁶⁾.

Se observó entonces un descenso en el porcentaje de oxígeno presente en la mezcla de reacción, que fué registrado por la interfase.

Después de cierto tiempo la velocidad de consumo inicial decrece y se vuelve constante; por tanto se suspendió la prueba en este momento.



CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

-CALIBRACION

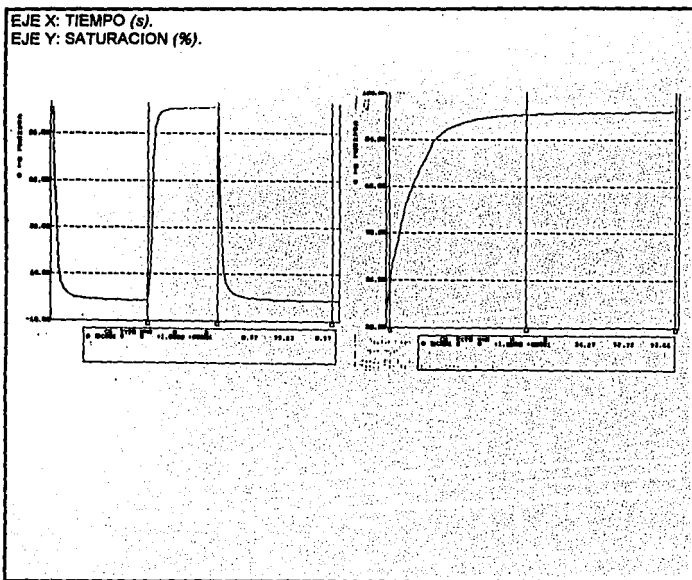
En las siguientes figuras se muestran las curvas obtenidas al realizar la calibración en gas y líquido respectivamente:

FIGURA 16

RESPUESTA DEL ELECTRODO EN GAS

FIGURA 17

RESPUESTA DEL ELECTRODO EN LIQUIDO





En donde:

A = zona de la gráfica en la que se inyectó nitrógeno.

B = zona de la gráfica en la que se inyectó oxígeno.

Como es de esperarse la obtención de estado estacionario es más rápido en el gas que en el líquido. Este tiempo depende obviamente del flujo que sea inyectado, en este caso por ser un valor muy pequeño no se pudo determinar; pero se procuro que fuera constante en ambos medios manipulando la válvula de cada tanque (nitrógeno y oxígeno) a patrón constante de la válvula de 3 vías, es decir, ya sea abierta ó cerrada, pero al 100%, para ambos.

Se obtuvo un tiempo de estado estacionario en gas 2.5 veces menor que en líquido, como promedio de todas las calibraciones realizadas (cada vez que se iba a realizar alguna prueba).

-PROTEINA

Para el análisis de los datos obtenidos fué necesario construir la curva estándar de la solución de albúmina; en la cual se localizaron los puntos de absorbancia obtenidos experimentalmente y la correspondencia de estos con el porcentaje de proteína. En las figuras 18 y 19 se encuentran representadas estas curvas estándar.



FIGURA 18
DETERMINACION DE PROTEINA I

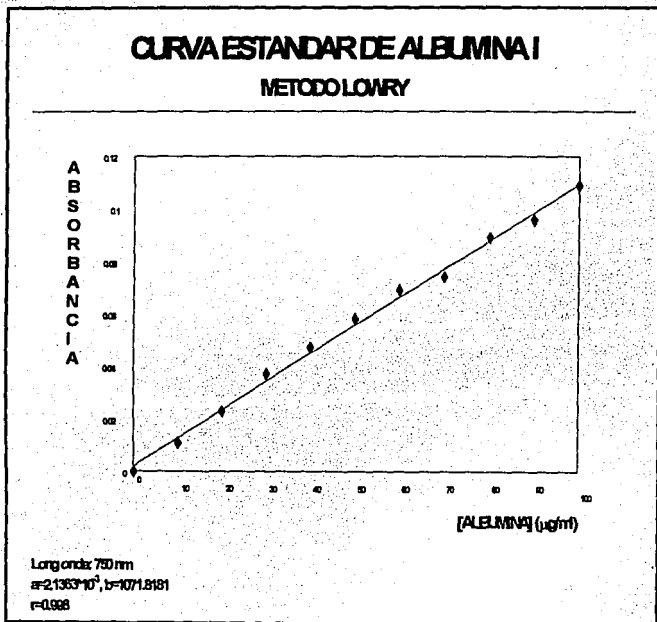
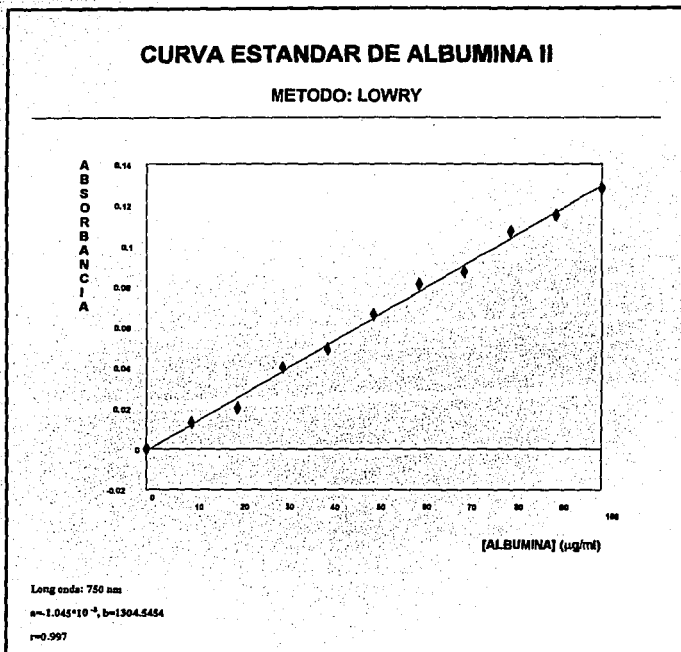




FIGURA 19
DETERMINACION DE PROTEINA II



La razón por la que existen dos curvas estandar, es porque se realizó la prueba 4 veces, pero el comportamiento adecuado y esperado lo muestran las gráficas I y II. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de ambas (referidas como ensayo 1 y ensayo 2):



TABLA 5
RESULTADOS DE PROTEINA POR METODO DE LOWRY

enzima ($\mu\text{g/ml}$)	enzima corr ensayo 1 ($\mu\text{g/ml}$)	enzima corr ensayo 2 ($\mu\text{g/ml}$)
30	20.3	25.3
50	40.9	37.5
80	61.4	62.1
100	74.5	75.1

De las mediciones se obtuvieron valores de 78.0% y 75.2% de proteína, teniendo como valor medio $76.6\% \pm 1.4$ de proteína soluble.

Estos valores son el resultado de gráficas con un coeficiente de regresión de 0.997 y 0.998.

De acuerdo a la bibliografía^(19,20) se puede realizar la preparación de la enzima antes de su uso en estudios cinéticos, siendo básicamente un paso de purificación por medio del centrifugado de la enzima en solución, que anteriormente ha sido macerada. Ya que la enzima ha sido purificada se obtienen valores de proteína cerca del 90 %⁽³²⁾.



-CONCENTRACION DE FAD ACTIVO.

Como se mencionó, la determinación del FAD activo (base de la reacción enzimática) es de suma importancia, para no incurrir en errores al considerar la concentración de la enzima como la cantidad de polvo pesado; sino la cantidad de grupos flavin que están disponibles para la reacción.

Una vez que se realizaron los experimentos, se obtuvieron gráficas del espectrofotómetro donde la absorbancia se encuentra en función de la longitud de onda en nanómetros, de las cuales se extrajeron los picos máximos. De este análisis se obtuvo lo siguiente:

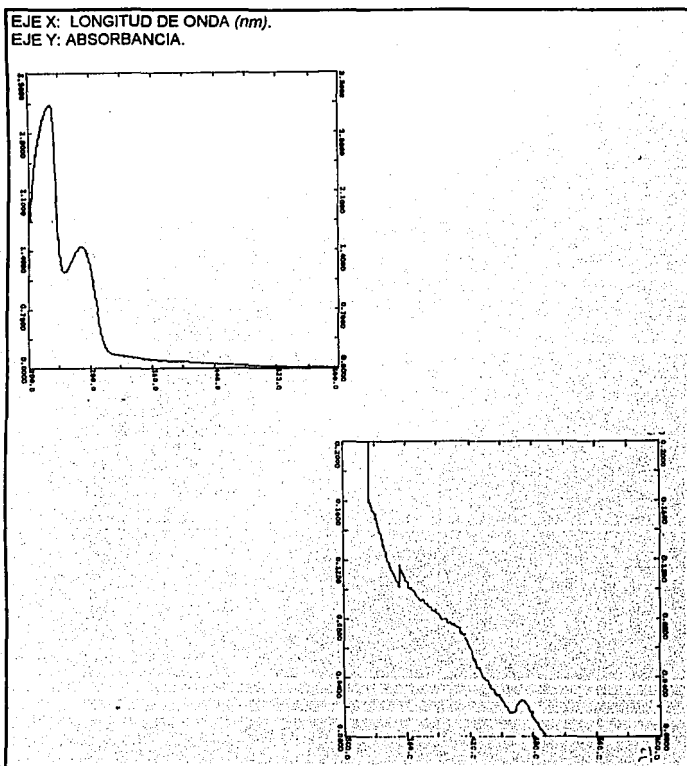
Para longitudes de onda de 200 a 600nm y absorbancia de 0.0 a 3.5 se detectó como pico principal el de 230nm y otro a 288nm, como se muestra en la figura 20; cuyos valores no son concordantes con la bibliografía que indica un pico a 280nm⁽²⁷⁾ debidos a la proteína.

Al cambiar las escalas de 300 a 600nm y de 0.00 a 0.2; se hacen evidentes otros picos a 398nm y 470nm siendo este último el que se tomó como el de longitud de onda máxima para la enzima, como se vé en la figura 21.



FIGURA 20
DETERMINACION DE LONGITUD
DE ONDA MAXIMA I

FIGURA 21
DETERMINACION DE LONGITUD
DE ONDA MAXIMA II





A partir de este punto las soluciones de enzima preparadas posteriormente se midieron considerando la absorbancia a $470nm$ como el valor correcto a introducir en la relación de Lambert-Beer.

Al obtener el valor de absorbancia a la longitud de onda ya mencionada e introducir el valor en la ecuación se obtuvo la concentración de enzima de $1.1709 \times 10^{-8} MFAD$, que es la que se empleó para realizar los experimentos cinéticos.

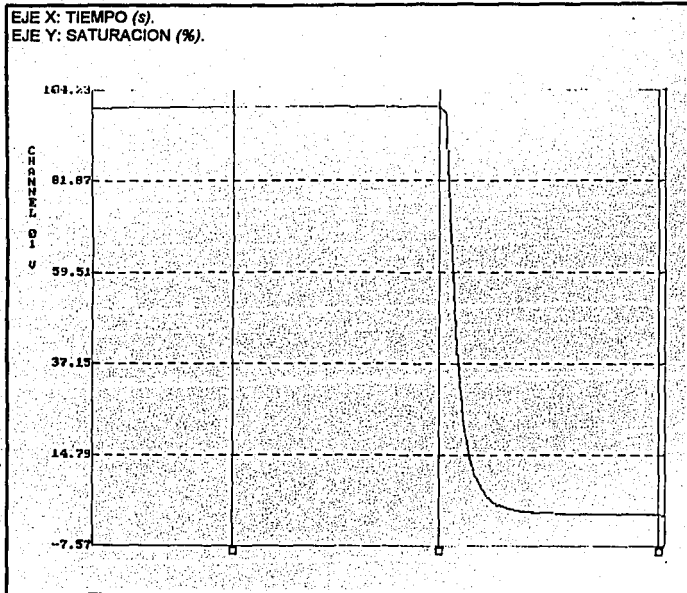
Haciendo cálculos con las propiedades ya conocidas de la enzima como el peso molecular, porcentaje de proteína, grupos de FAD por cada mol de enzima y peso molecular del FAD se esperaba tener una concentración aproximada a $4.7788 \times 10^{-8} MFAD$; ya que a esta concentración se cumple la condición de Haldane de pseudo estado estacionario; lo que también sucede con el valor obtenido de la lectura espectrofotométrica a las diferentes concentraciones de glucosa y oxígeno manejadas.

-ACTIVIDAD DE GLUCOSA OXIDASA

Al realizar las pruebas de actividad se obtuvieron gráficas de la forma que se muestra en la figura 22, que es la homologa de la figura 5. página 22.



FIGURA 22
RESPUESTA EN LA DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE G.O.



Esta es la curva que se obtiene al tener concentración de oxígeno constante a 100% de saturación junto con la enzima y adicionar la solución de glucosa.



El análisis de los datos se realizó de dos formas diferentes, como se muestra a continuación:

-Por el método de normalización de la curva experimental se realizó lo siguiente:

Al trazar gráficamente los datos que se obtuvieron de tiempo y concentración de oxígeno, debe conocerse exactamente cuál es el valor de t_0 ó tiempo inicial de la reacción.

Para poder realizar el análisis se definió la siguiente relación:

$$G = \frac{(H - H_0)}{(H_s - H_0)}$$

Donde

G = Constante de normalización de la gráfica.

H = lecturas de % de oxígeno obtenidas de la interfase.

H_0 = promedio de los valores aproximadamente constantes de % de oxígeno al final de la reacción.

H_s = promedio de los valores aproximadamente constantes de % de oxígeno al inicio de la reacción.

De la cual se pudo obtener $G_1 = 1 - G$ y de este $G_2 = \ln G_1$.

Al trazar las gráficas de $\ln G_1$ en función del tiempo y considerando los primeros segundos al trazar la tangente a la curva, se obtiene la velocidad de la reacción cuyo valor se requiere para hacer el cálculo de la actividad, al representar la velocidad inicial de la reacción.

El análisis se basa en la consideración de que la reacción tiene el comportamiento de una ecuación de primer orden, ya que la concentración de glucosa es la de saturación y por tanto el comportamiento se puede representar con la siguiente ecuación:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k[A]$$



Donde

[A] = Concentración molar de oxígeno.

$-\frac{d[A]}{dt}$ = Velocidad con que disminuye el oxígeno.

k = Velocidad de reacción específica.

De lo anterior se obtiene:

$$\frac{\log[A_0]}{[A]} = \frac{kt}{2.303}$$

Por tanto, la velocidad que se obtuvo de la gráfica de $\ln G_1$ vs tiempo, debe multiplicarse por 2.303, además por 2.0 debido a la influencia que tiene el oxígeno extra producido por la catalasa al descomponer el H_2O_2 en el sistema, haciendo que la relación entre glucosa y oxígeno sea una mol de O_2 por 2 de glucosa^(3,38) y por la solubilidad del oxígeno a las condiciones de reacción; ya que la k tiene unidades de 1/s.

Para el cálculo de la solubilidad de oxígeno en el medio de reacción ver el anexo 2 en la página 91; en el cual se detalla el método seguido; ya que considerar la solubilidad del oxígeno en agua sin sus constituyentes tales como sales, componentes orgánicos, etc; es un error en el que han incurrido otros autores.

El resultado promedio obtenido para la actividad de glucosa oxidasa es de $473.8 \frac{\mu mol O_2}{min}$ y expresado con base en el centro catalítico se obtiene $472.4 \frac{\mu mol O_2}{min * \mu mol FAD}$

Por otro lado el cálculo por medio de la velocidad inicial, se basa al igual que para la determinación de las constantes cinéticas en el método del espejo; obteniendo la tangente a la curva en los primeros segundos de la reacción; pero sin introducir la constante de normalización.

Es importante mencionar que se obtuvo un valor promedio de saturación del medio con oxígeno a 99.5983% y 99.5925% en las dos series de experimentos que se realizaron.



Tomándose cada valor como la base para hacer los cálculos de solubilidad y no tener así dispersión en las gráficas al iniciar a diferentes porcentajes.

El resultado promedio obtenido de este análisis es $1431.7 \frac{\mu\text{molO}_2}{\text{min}}$, que debido a la presencia de la catalasa debe multiplicarse por 2; además para expresar la actividad con base en el centro activo se emplea la concentración de enzima determinada espectrofotométricamente y de esto se obtiene $244\ 546.9 \frac{\mu\text{molO}_2}{\text{min} \cdot \mu\text{molFAD}}$

Este último resultado es 6 veces más grande que el obtenido por el método de normalización. Este método de normalización considera todo el tiempo transcurrido desde que se inicia la reacción, hasta que se obtiene un valor constante cuando ya se ha extinguido el sustrato (glucosa); de aquí la diferencia en los resultados.

La comparación con los datos bibliográficos no es muy válida ya que se encuentran expresados con base en otros elementos participantes en la reacción y a diferentes condiciones.

-ACTIVIDAD DE CATALASA.

El análisis gráfico realizado para la actividad de glucosa oxidasa se repite en este caso, pero debido a que el sustrato para esta enzima es el peróxido de hidrógeno, la respuesta que se obtiene es de generación de oxígeno.

No se pudo calcular la solubilidad del oxígeno en el buffer de acetatos ya que no se contó con los valores de las constantes necesarios para realizarlo, por lo que se empleó el dato de solubilidad en agua.

Al obtener la tangente a la curva se obtuvo la velocidad inicial de la reacción, cuyo valor representa la actividad que es de $41.3 \frac{\mu\text{molO}_2}{\text{min}}$



-CONSTANTES CINÉTICAS.

Como se propuso en el diseño experimental, se emplearon concentraciones de oxígeno de 5, 15, 25, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 100; pero en el caso de concentraciones menores a la de la solubilidad de oxígeno en agua como 5 y 15%, se tuvieron los siguientes problemas:

-Al provocar una concentración de oxígeno cercana a cero con el nitrógeno introducido y pretender estabilizar al menos por 3-5 s la concentración; por la agitación aplicada, no logró conseguirse este objetivo, ya que el porcentaje aumentaba continuamente introduciendo el oxígeno del medio ambiente a la solución.

Si se añadía la glucosa para iniciar la reacción, el electrodo no captaba ningún cambio sino después de transcurridos varios segundos; viéndose modificados los valores de t_0 y V_0 ; siendo por tanto inadecuado este método si se desea analizar estas concentraciones.

El resto de los datos obtenidos de las series experimentales realizadas se analizaron de la siguiente forma:

-Se expresaron los datos obtenidos de porcentaje de oxígeno en unidades de concentración molar de oxígeno, por medio del método que se expresa en el anexo 2 (página 91) y el tiempo en segundos.

Al trazar la gráfica de estos datos se obtiene la curva de consumo de oxígeno a través del tiempo, debida a la enzima. Para cada curva obtenida se evaluó el intervalo de datos a emplear para la determinación de la velocidad inicial, que en general fué de 5 a 8 s.

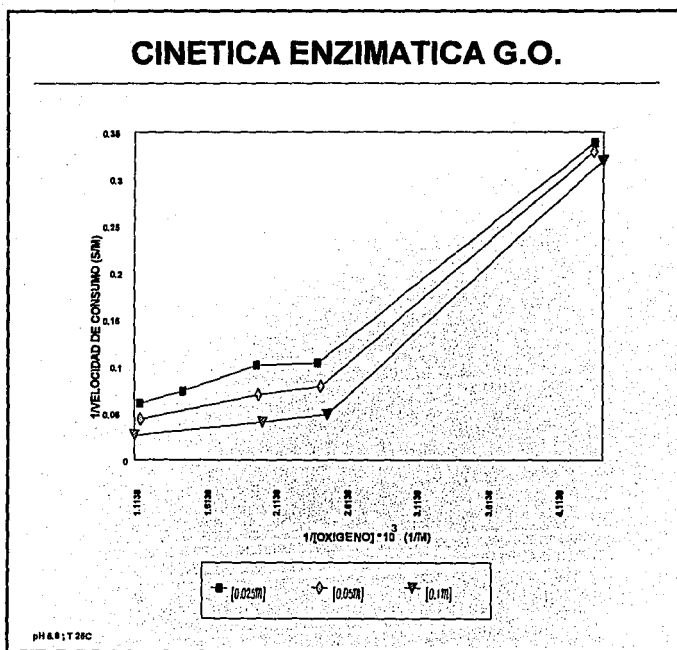
Se trazó la gráfica sólo de los puntos seleccionados en una curva nuevamente de la concentración de oxígeno en función del tiempo. Esto se realizó en papel milimétrico, para poder evaluar por el método del espejo la pendiente de la línea tangente a la curva.

La velocidad inicial obtenida tiene unidades de s^{-1} , por lo que se dividió entre el valor de $1.1709 \times 10^{-8} M$ (concentración de la enzima con base en el FAD); obteniendo así M/s .



Como es de esperarse, la velocidad inicial debe tener un valor más alto conforme aumenta la concentración de oxígeno; por lo que en los casos en los que los datos no mostraban este comportamiento, además de coherencia con respecto a las demás concentraciones de glucosa empleadas; se desearon. Esto puede verse en la figura 23 que se presenta a continuación.

FIGURA 23
GRAFICA SUMATORIA EXPERIMENTAL





De acuerdo al método de análisis para las enzimas de este tipo, debe construirse la gráfica primaria con los inversos de la velocidad inicial y de la concentración de oxígeno. De esta gráfica deben obtenerse líneas paralelas para las diferentes concentraciones de glucosa (siendo en este caso 0.025M, 0.05 y 0.1M); al igual que en la anterior, se desecharon datos que se encontraban fuera de la tendencia.

Como se vé en la figura 24 se obtuvieron los siguientes resultados:

FIGURA 24

GRAFICA PRIMARIA EXPERIMENTAL

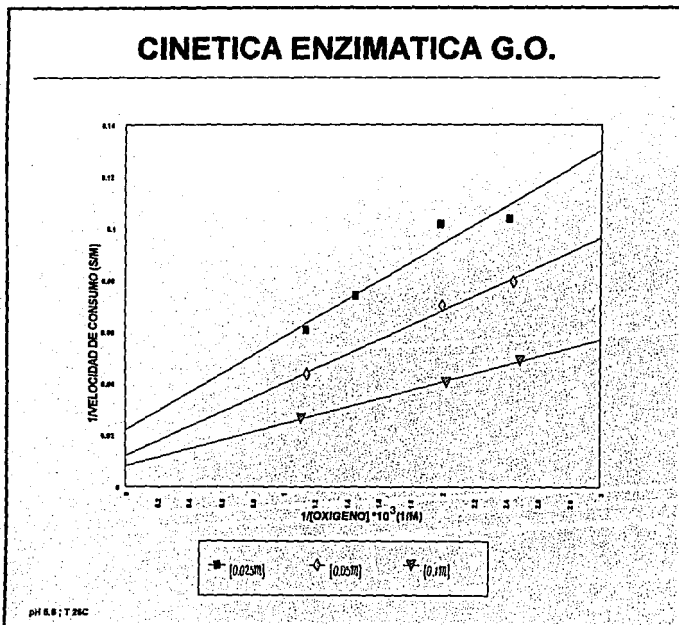




TABLA 6

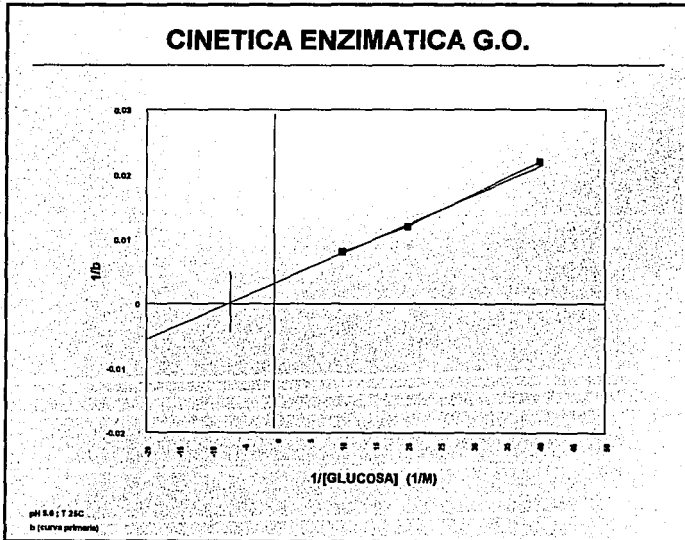
RESULTADOS GRAFICOS DE LAS CONSTANTES CINETICAS

CONCENTRACION (M)	m	b	r
0.025	3.6024×10^{-5}	0.0219	0.962
0.05	2.8056×10^{-5}	0.0120	0.995
0.1	1.6283×10^{-5}	8.0598×10^{-3}	0.998

Los valores de la ordenada al origen se emplean para generar la gráfica secundaria, junto con el inverso de las concentraciones de glucosa. Esto puede verse en la figura 25:

FIGURA 25

GRAFICA SECUNDARIA EXPERIMENTAL





De ella se obtuvieron los siguientes valores:

$$b = 3.089 \times 10^{-3} \text{ s/M}$$

$$m = 4.675 \times 10^{-4}$$

$$r = 0.998$$

Del valor de b se puede obtener $V_{m\acute{a}x}$; ya que su relación es:

$$b = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

$$\text{por tanto } V_{m\acute{a}x} = 323.7293 \text{ M/s}$$

Una vez que se conoce $V_{m\acute{a}x}$ se pueden calcular las constantes de Michaelis para cada sustrato de la siguiente forma:

-Para calcular K_m del oxígeno se emplea el promedio de las pendientes obtenidas de la gráfica primaria en la siguiente relación:

$$m_{\text{promedio}} = \frac{K_m_{\text{ox}}}{V_{m\acute{a}x}}$$

$$\text{De lo anterior se obtuvo } K_m \text{ oxígeno} = 8.6717 \times 10^{-3} \text{ M}$$

-Para calcular K_m de glucosa se emplean los datos obtenidos en la gráfica secundaria por medio de:

$$m = \frac{K_m_{\text{glu}}}{V_{m\acute{a}x}}$$

$$\text{Por tanto } K_m \text{ glucosa} = 0.1513 \text{ M}$$

Estos datos obtenidos de $V_{m\acute{a}x}$ sólo pueden ser comparados parcialmente con los dados por Gibson (ver tabla 3 de la página 12), ya que los restantes están expresados en s^{-1} y no se expresan las concentraciones de enzima empleadas.



Es importante resaltar que el método aplicado para expresar la concentración de oxígeno disuelto en el medio de reacción pocas veces ha sido empleado, a pesar de su utilidad; ya que lleva implícitas las sales y componentes del medio que disminuyen el valor del oxígeno disuelto.

De acuerdo a Linek (1981)⁽²⁾, la solubilidad del oxígeno en mezcla de reacción a una presión parcial de 760 Torr se adecúa a la ecuación:

$$C_o^s = 1127 * 10^{-3} \exp\left(\frac{1395}{273+t_0} - 0.2522C_G\right)$$

Y para oxígeno puro, concentración de glucosa de 0.5M y temperatura de 25 °C; se obtiene $C_o^s = 1.022 * 10^{-3} \frac{mol}{l}$, siendo comparable con el valor de $9.195 * 10^{-4} mol/l$ que se obtuvo y se empleó en la valoración de las constantes.



CAPITULO IV

CONCLUSIONES

El haber realizado la experimentación con un preparado comercial de la enzima glucosa oxidasa, implicó que la experimentación no se realizó con la enzima al máximo de pureza; es decir, se empleó la mezcla de enzimas que conforman la glucosa oxidasa, catalasa, invertasa (que juntas tienen 76.59% de proteína) y otras contaminaciones (que representaron 23.41%). Este hecho nos llevó a determinar la concentración de grupos flavín que al actuar como acarreadores llevan a cabo la reacción, sin importar tanto la cantidad de enzima contenida.

El manejo de la concentración con base en los grupos FAD, es más útil ya que permite referirse más explícitamente a las actividades de centro activo, ya que varios autores muestran resultados en base a la concentración de enzima sin especificar la pureza.

El sistema de reacciones que compone la glucosa oxidasa consta del paso de glucosa a D-gluconolactona (con generación de peróxido de hidrógeno) y de ésta a ácido glucónico, cuyo ciclo es posible mientras se encuentren presentes la enzima catalasa y la lactonasa. La primera para evitar la acumulación del peróxido que inhibe la reacción, además de la generación de oxígeno y la segunda que puede sustituirse por una temperatura que desencadene el próximo paso o realice la misma función que la enzima. Esto significa que el manejo adecuado de las concentraciones y condiciones en el experimento llevó a establecer el ciclo de oxidación y reducción de la enzima en el tiempo que se consideró para la evaluación de la velocidad inicial.



Por lo general, la evaluación de esta velocidad inicial se llevó a cabo en un intervalo de tiempo de 5 s, siendo la velocidad de toma de datos mínima de la interfase empleada de 1 s. De acuerdo con la bibliografía es más adecuado el uso de toma de datos cada 0.1 s, lo que puede implicar que la reacción ya esté en la zona de descenso constante a los 5 s que se tomaron en esta experimentación. Aunque cabe hacer notar que el gradiente de concentraciones en la mayoría de las gráficas toma valores de $1 \cdot 10^{-7} M$; lo que manifiesta el cuidado que debe tenerse al manejar este tipo de datos.

Idealmente se debería contar con una interfase que tomara el mayor número de datos en el menor tiempo posible; pero si se tiene en mente el objetivo principal, entonces un análisis a niveles tan depurados no es práctico. Es decir, la toma de un dato en un segundo puede ser suficiente y representativo para la evaluación de las constantes cinéticas sin tanta sensibilidad en el aparato de medición.

Estableciéndose además la importancia que tiene el contar con aparatos de control y medición acordes a la escala que se maneje; es decir, para tanques manejados generalmente a escala laboratorio o planta piloto el electrodo empleado posiblemente es más adecuado, en el sentido de los tiempos transcurridos para que los cambios efectuados en el sistema en agitación lleguen al electrodo. A volúmenes pequeños, la capacidad de respuesta del electrodo es determinante, ya que en el preciso momento del primer ciclo reactivo de la enzima; el electrodo mediante sus propias reacciones, debe ser capaz de enviar la señal de decremento o incremento de oxígeno (según sea el caso). Aún con el tiempo de 1 s de captura de datos, se puede decir que se toma una porción representativa de las velocidades de consumo, ya que estamos hablando de niveles de un gran número de moles transformados en un segundo.



Por otro lado, la determinación de las constantes cinéticas por medio del electrodo de oxígeno es adecuada, ya que no es necesario adicionar sustancias extrañas al medio, ni contar con aparatos de mucha sofisticación como lo sería el uso del método manométrico o por medio de un espectrofotómetro; además que a escalas mayores o tanques lo usual es contar con un electrodo de oxígeno.

De los resultados obtenidos para las constantes $K_{m_{GlU}}$ y $K_{m_{Ox}}$ cuyos valores son comparativamente grandes con los que se muestran en la bibliografía para la misma temperatura y sustratos; pero diferente método de obtención; se puede decir que precisamente al mostrar un K_m más grande tienen un poco menos afinidad hacia el sustrato, atribuyéndose esencialmente a que no se trata de enzima pura.

La determinación de las constantes cinéticas forma la parte más trascendental para la evaluación de coeficiente de transferencia de masa gas-líquido, de acuerdo al planteamiento principal de este trabajo, ya que si se obtienen estas en soluciones Newtonianas de baja y alta viscosidad como en soluciones ligeramente no-Newtonianas; nos encontraremos en posibilidades de establecer la consistencia de las constantes cinéticas en estos medios y poder emplearlas en la ecuación de transferencia de masa y determinar K_a en situaciones que se requiera; con la certeza de que los cambios verificados en el sistema se deben a la transferencia gas - líquido y no a la cinética enzimática.

A pesar de que en este estudio no se muestran los resultados obtenidos en soluciones no-Newtonianas, se hicieron varias pruebas en soluciones Newtonianas de alta viscosidad, empleando mezclas de glicerol y buffer de fosfatos a valores de 0.0178, 0.0239, 0.0733 y 0.1576 Pa s, observándose que mediante la metodología antes expresada, se dificulta mucho el obtener valores de % de oxígeno disuelto estables, y más tratándose de porcentajes menores a 50% de saturación. La respuesta a este problema probablemente se encuentra en el



replanteamiento el sistema experimental empleado en este estudio, ya que vale la pena llevar a cabo estas determinaciones.

Por lo anteriormente mencionado, es válido mencionar que se ha concluido sólo una etapa de un proyecto amplio cuyo fundamental interés radica en el nivel de velocidad que lleva implícitos y que permite el empleo y aporte de conocimientos.

**BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

- 1.- Bentley R. (1963). "Glucose Oxidase", en "The Enzymes". Boyer, P.D.y Lardy, H. Volumen 7., 567-586. Editorial: Academic Press. N.Y.
- 2.- Calva Valderrábano, M. C. (1985). "Estudio de Transferencia de Oxígeno en un Fermentador Air-lift Rectangular". Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- 3.- Certucha Llano, L.E. (1979). "Consideraciones teóricas sobre la obtención de glucosa oxidasa mediante el empleo de *Aspergillus niger*". Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- 4.- Cleland W.W. (1962). The Statistical Analysis of Enzyme Kinetic data. Advances in Enzimology, 29, 1-22.
- 5.- Colowick S. P. (1955). "Methods in Enzymology". Volumen 1. Editorial: Academic Press INC. N.Y.
- 6.- Ditts, R.V. (1974). "Analytical Chemistry". Editorial: D. Van Nostrand Co.
- 7.- Dixon, M. y Webb, E. (1979). "Enzymes". Editorial: Academic Press. N.Y.
- 8.- ECO. Manual de Operación y Manejo de Software del Datalogger M5000.



- 9.- Fukushima S. y Uyama A. (1978). Oxygen Absorption Accompanying Enzymic Reaction - Oxidation of D-glucose In the Presence of Glucose Oxidase and Catalase-. J. Chem. Eng. (Japan). 11 (3), 227-233.
- 10.- Garzon G., G. (1980). "Fundamentos de Química General". Editorial: McGraw-Hill. México.
- 11.- Gerhartz W. (1990). "Enzymes in Industry. Production and Applications". Editorial: VCH.
- 12.- Gibson Q., Bennett E. y Massey V. (1964). Kinetics and Mechanism of Action of Glucose Oxidase. J. Biol. Chem., 239 (11), 3927-3934.
- 13.- Hiromi, K. (1979). "Kinetics of Fast Enzyme Reactions. Theory and Practice" Editorial: Halsted Press.
- 14.- Hiseh D., Silver R. y Mateles R. (1969). Use of the Glucose Oxidase System to Measure Oxygen Transfer Rates. Biotechnol. Bioeng., 11, 1-18.
- 15.- Ho C., Ju L. y Baddour R. (1988). The Anomaly of Oxygen Diffusion in Aqueous Xanthan Solutions. Biotechnol. Bioeng., 32, 8-17.
- 16.- INGOLD. Manual de Operación y Mantenimiento del Electrodo Polarográfico
INGOLD.



- 17.- Laguna, J. (1980). "Bioquímica". Editorial: La Prensa Médica Mexicana. México.
- 18.- Linek V. y Benes P. (1977). Multiregion, Multilayer, Nonuniform Diffusion Model of an Oxygen Electrode. *Biotechnol. Bioeng.*, 11, 741-748.
- 19.- Linek V., Benes P., Hovorka F. y Holecek O. (1981). Use of Glucose Oxidase System in Measuring Aereation Capacity of Fermentors, Comparison of the Dynamic and Steady-State Methods of K_{La} Measurement. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1487-1484.
- 20.- Linek V., Sinkule J. y Benes P. (1991). Critical Assessment of Gassing-In Methods for Measuring K_{La} in Fermentors. *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 323-330.
- 21.- Linek V. y Vacek V. (1976). Oxygen Electrode Response Lag Induced by Liquid Film Resistance Against Oxygen Transfer. *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 1537-1555.
- 22.- Martínez Villagran, R. D. (1986). "Análisis de Modelos de Mecanismos Cinéticos Enzimáticos". Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- 23.- Mondragón Jaimés, L. (1989). "Evaluación y Aplicación de técnicas Analíticas en el Area Alimentaria". Tesis, Facultad De Química UNAM.
- 24.- Parker J.W. y Schwartz C.S. (1987). Modeling the Kinetics of Immobilized Glucose Oxidase. *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 724-735.



- 25.- Prowman, K.M. (1972). "Enzyme Kinetics. Series in Advanced Chemistry". Editorial: Mc Graw-Hill.
- 26.- Purich, D.L. (1979). "Methods in Enzymology". Volumen 63. Enzyme Kinetics and Mechanism. Parte A. Editorial: Academic Press.
- 27.- Quirasco Baruch, M.C. (1990). "Obtención de Acido Glucónico y Glucosa Oxidasa por Vía Fermentativa". Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- 28.- Rosenberg L., J. (1980). "Teoría y problemas de química general". Editorial: McGraw-Hill. México.
- 29.- Schumpe A. y Quicker G. (1982). Gas Solubilities in Microbial Culture Media. Adv. Biochem. Eng., 24, 1-38.
- 30.- Segel I.H. (1975). Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. Editorial: John Wiley and Sons.
- 31.- Stejskal J. y Potucek F. (1989). Oxygen Transfer in Liquids. Biotechnol. Bioeng., 33, 578-583.
- 32.- Swoboda B.E.P. y Massey V. (1965). Purification and Properties of the Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. Journal of Biological Chemistry, 240 (5), 2209-2215.



- 33.- Tecante C. A. (1991). "Mass Transfer in Rheologically Complex Fluids in Helical Screw Ribbon-agitated and Aerated Tank". Ph. D. thesis, Université Laval, Québec, Canada.
- 34.- Ulrich, H. (1974). "Methods in enzymatic Analysis". Volumen 1. Editorial: VCH.
- 35.- Umbert, W.W., Burris, R.H. y Stauffer J.F. (1959). "Manometric Techniques". Editorial: Burgess Publishing Co.
- 36.- Venugopal R. y Saville B.A. (1993). The Effect of Oxygen Upon the Kinetics of Glucose Oxidase Inactivation. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 71, Diciembre, 917-924.
- 37.- Weibel M.K. y Bright H.J. (1971). The Glucose Oxidase Mechanism. The Journal of Biological Chemistry, 248 (9), 2734-2744.
- 38.- Whitaker, J.R. (1972). "Principles of Enzymology for Food Sciences". Volumen 2. Editorial: Marcel Dekker Inc. N.Y.
- 39.- Zee D. (1978). How it Works. The Oxygen Electrode. Laboratory Medicine for Practicing Physicians, Julio-Agosto, 45-49.



ANEXOS

1. CUANTIFICACION DE PROTEINA. METODO DE LOWRY (FOLIN-CIICALTEU)

La pureza de la enzima a trabajar es uno de los primeros factores que deben tomarse en cuenta en cualquier estudio cinético, siendo obviamente deseable tener una preparación lo más pura y homogénea posible; para evitar problemas en la interpretación y comparación de datos; sin embargo, una cuestión interesante de los estudios cinéticos es que pueden llevarse a cabo con preparaciones impuras si no se tienen reacciones alternativas. Siendo uno de los objetivos de este trabajo el empleo de las preparaciones comerciales crudas, es decir, sin purificaciones posteriores (ver capítulo de materiales y métodos en página 41).

La determinación se basa en la cuantificación de proteínas a partir de dos reacciones:

-Reacción de Biuret (interacción de proteínas con el reactivo cúprico en medio alcalino; formando un complejo cúprico coloreado debido a la presencia de uniones peptídicas).

-Reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotungstico por tirosina y triptofano presentes en la proteína-cobre (donador de electrones) ^(34,23).

Este método es relativamente consumidor de tiempo, pero da resultados precisos y reproducibles, además de ser sensible; cerca de 20 veces más sensible como el método UV y 100 veces más que el de Biuret ⁽³⁴⁾.

**PROCEDIMIENTO:**

Debido a que los reactivos cambian durante el almacenamiento, afectando la intensidad del color obtenido; debe construirse una curva estándar para cada determinación (34).

Se preparó una serie de soluciones patrón de albúmina bovina fracción V (MERCK) con contenido proteínico reportado por el fabricante mayor a 90%, para un intervalo de 10 - 100 μ g/ml.

Esto se logró tomando como base una solución de 10 μ g/ml y realizando las siguientes diluciones:

TABLA 7
CONCENTRACIONES DEL METODO DE LOWRY

TUBO	SOL. PROTEINA (ml)	AGUA (ml)	PROTEINA(μ g/ml)
1	0	1.0	0.0
2	0.1	0.9	10.0
3	0.2	0.8	20.0
4	0.3	0.7	30.0
5	0.4	0.6	40.0
6	0.5	0.5	50.0
7	0.6	0.4	60.0
8	0.7	0.3	70.0
9	0.8	0.2	80.0
10	0.9	0.1	90.0
11	1.0	0.0	100.0



De manera opcional (en los casos que la muestra lo requiera) de acuerdo con lo recomendado bibliográficamente se puede realizar otra serie que se desprenda del tubo 2, para obtener concentraciones de 5 a 10 μg como se vé a continuación:

TABLA 8
CONCENTRACIONES OPCIONALES PARA EL METODO DE LOWRY

TUBO	SOL.PROTEINA (ml)	AGUA (ml)	PROTEINA ($\mu\text{g/ml}$)
12	0.5	0.5	5.0
13	0.6	0.4	6.0
14	0.7	0.3	7.0
15	0.8	0.2	8.0
16	0.9	0.1	9.0

Las tablas anteriores pueden servir de guía, ya que no necesariamente se tienen que preparar todos los tubos mencionados.

Se preparó además la solución problema de enzima glucosa oxidasa (E.C. 1.1.3.4.) para 5 muestras en un intervalo de 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$; haciendo las mismas diluciones que para la solución patrón.

Se prepararon además los siguientes reactivos:

- A) Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1 N.
- B) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% en tartrato doble de sodio y potasio al 1%.
- C) Solución de cobre alcalino. Mezclar 50 ml de A con 1 ml de B , descartar después de 24 h.
- D) Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:1 con agua destilada.



Se tomaron 0.2 *ml* de la solución problema y se mezclaron con 3 *ml* de solución C proporcionando buena agitación y con un tiempo de reposo de 10 *min* a temperatura ambiente.

Se adicionaron 0.3 *ml* de reactivo D, mezclando y dejando reposar a temperatura ambiente por 30 *min*.

Al preparar la serie de tubos de acuerdo a lo mencionado, el tubo 1 sin proteína sirvió como testigo para las mediciones de absorbancia en el espectrofotómetro PERKIN ELMER UV/VIS Lambda 3B, que previamente fué calibrado con este tubo testigo. Las celdas empleadas para las mediciones fueron de cuarzo de 4 *mm* de compartimiento para la muestra.

Una vez que el color se desarrolló se hicieron lecturas en el espectrofotómetro a 750 *nm*⁽²³⁾.



2.- CALCULO DE SOLUBILIDAD DE OXIGENO

La solubilidad del oxígeno es fundamental en los cálculos realizados en este trabajo ya que es responsable del diferencial de concentración para la transferencia de masa entre la fase líquida y la gaseosa; y en general en las biociencias en tecnología de fermentaciones, cultivo de algas, tecnología marina, tratamiento de aguas de desperdicio, fisiología; y se requieren para⁽³⁰⁾:

- Establecer balances de materia.
- Para calcular coeficientes estequiométricos.
- Para determinar coeficientes volumétricos de transferencia de masa.
- Para diseño y escalamiento de bioreactores.

La mayoría de los datos disponibles en bibliografía están referidos a sistemas simples como soluciones de sales simples o compuestos orgánicos; sin embargo, los medios de cultivo microbiano pueden ser bastante complejos.

Existen dos métodos para determinar la solubilidad; los químicos, para analizar las soluciones saturadas de gas y los físicos, que determinan la cantidad de gas necesaria para saturar el solvente inicialmente libre de gas (llamados métodos de saturación) ó el gas que puede ser desorbido de la solución saturada (métodos de desorción).

Los parámetros que afectan las solubilidades de los gases en medios de cultivo microbiano son la presión (cuyo comportamiento queda descrito por la ley Henry) y la temperatura (las solubilidades disminuyen fuertemente con el incremento de temperatura)⁽³⁰⁾.

Los datos con que se cuentan son los coeficientes de Bunsen α_0 de oxígeno en agua en un intervalo de 0 a 50°C, que han sido calculados de acuerdo a la siguiente correlación:

$$\alpha_0 = a + bt + ct^2 + dt^3 + et^4$$



Estos coeficientes pueden convertirse en mediciones de solubilidad por medio de conversiones de ecuaciones, para generar:

$$c(\text{mg}/\text{l}^{-1}) = \frac{10^6 M_G P}{V_0 101.3} \alpha$$

Donde:

p = presión parcial del gas (KPa).

M_G = peso molecular (g mol^{-1}).

V_0 = volumen molar del gas a 0°C y 101.3 KPa ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$).

para oxígeno tiene el valor de 22 395.

Para la concentración de oxígeno en equilibrio con aire saturado con vapor de agua se tiene la siguiente ecuación:

$$c(\text{mgO}_2/\text{l}^{-1}) = \frac{10^6 * 32 * 0.2094(P_{\text{atm}} - P_v)}{22,395 * 101.3} \alpha$$

El fenómeno "salting-out" de los gases puede describirse por la ecuación empírica de Sechenov (30):

$$\log \frac{c_0}{c} = K_s c_s$$

En donde las constantes están dadas:

$$K_s = h \frac{1}{2} \sum x_i z_i^2$$

Siendo x_i es el número de iones del tipo i en la sal como:

$$c_i = x_i c_{\text{el}}$$

Schumpe et al. (30) propusieron el siguiente modelo:

$$\log \frac{\alpha_0}{\alpha} = \sum_i H_i I_i$$

Y:

$$I_i = \frac{1}{2} c_i z_i^2 \quad \text{Donde: } I_i \text{ es la fuerza iónica atribuible a un sólo ión.}$$

I y el parámetro H_i son específicos para el gas, el ión y la temperatura.



Para soluciones de una sola sal las constantes de Sechenov están dadas por :

$$K_s = \frac{1}{2} \sum H_i x_i z_i^2$$

Para solutos orgánicos la dependencia de la concentración de la solubilidad del gas puede describirse de manera análoga a el efecto de 'salting-out'.

$$\log \frac{\alpha_0}{\alpha} = K_s c_n$$

Donde:

c_n es la concentración del soluto orgánico.

K_s es una constante empírica, que corresponde a la constante de Sechenov K_s .

Quicker y Quicker et al. ⁽³⁰⁾ midieron solubilidades de oxígeno en soluciones mezcladas de diferentes azúcares y encontraron los efectos individuales para ser 'log additive', como en el caso de las sales:

$$\log \frac{\alpha_0}{\alpha} = K_1 c_{n1} + K_2 c_{n2} + \dots$$

En la experimentación realizada se emplearon los siguientes cálculos de solubilidad de oxígeno, considerando las sustancias involucradas en el medio de reacción y la teoría anteriormente expresada, como se muestra a continuación.

En forma general se siguieron los siguientes pasos:

1.- Para las soluciones buffer se consideraron las sales que están incluidas en cada uno de ellos (fosfatos y acetatos), así como la concentración.

Por ejemplo, para preparar buffer de fosfatos se requieren las siguientes soluciones:

NaH_2PO_4 0.1M

Na_2HPO_4 0.1M



De la bibliografía ⁽³⁰⁾ se obtienen las constantes dadas a 25°C, que es la temperatura empleada en la experimentación.

$$\text{Na}^+ = \text{H Na}^+ = -0.568 \text{ (} \mu\text{mol)}$$

$$\text{HPO}_4^{2-} = \text{H HPO}_4^{2-} = 0.447 \text{ (} \mu\text{mol)}$$

$$\text{H}_2\text{PO}_4^{1-} = \text{H H}_2\text{PO}_4^{1-} = 0.997 \text{ (} \mu\text{mol)}$$

Y empleando la ecuación:

$$K_s = \frac{1}{2} \sum H_i X_i Z_i^2$$

$$K_s = 0.5[-0.568(3)(1)^2 + 0.447(1)(-2)^2 + 0.997(1)(-1)^2]$$

Se obtiene la constante de Sechenov:

$$K_s = 1.201$$

Y de acuerdo a:

$$\log \frac{\alpha_o}{\alpha} = K_s * \text{concentració}$$

Se obtiene:

$$\log \frac{\alpha_o}{\alpha} = 0.1201$$

Para la solución de glucosa, se obtiene la constante de Sechenov de la siguiente forma:

$$K_s = 6.58 * 10^{-4} \frac{\text{l}}{\text{g}} * 180.16 \text{g}$$

$$K_s = 0.119$$

y tomando en cuenta la concentración de la solución de glucosa:

$$(0.025)(0.119) = 2.975 * 10^{-3}$$

$$(0.05)(0.119) = 5.95 * 10^{-3}$$

$$(0.1)(0.119) = 1.119 * 10^{-2}$$

$$(0.2)(0.119) = 2.38 * 10^{-2}$$



Considerando el valor obtenido de 0.1201 para el buffer y obteniendo la relación de α_0/α :

1.- 1.3276

2.- 1.3367

3.- 1.3529

4.- 1.3928

Estos valores se modifican en la siguiente relación:

$$CO_2 = \frac{10^5 * 32 * 1 * 98.13}{22395 * 101.3} * \frac{\alpha_0}{\alpha}$$

Obteniéndose los siguientes valores en mgO_2/l :

1.-29.635

2.-29.427

3.-29.081

4.-28.251



3.- PREPARACION DE SOLUCIONES BUFFER O AMORTIGUADORAS

3.1 BUFFER DE FOSFATOS

Para obtener una solución buffer de fosfatos concentración 0.1M, es necesario preparar dos soluciones:

A: Solución de fosfato de sodio monobásico 0.2M.

B: Solución de fosfato de sodio dibásico 0.2M.

Con base en la siguiente relación se obtienen los resultados deseados:

x ml de A + y ml de B , diluidos a un volumen total de 200 ml⁽⁵⁾

TABLA 9

RELACION DE SOLUCIONES PARA OBTENER BUFFER DE FOSFATOS

X	Y	pH	X	Y	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0



Tomando como guía el cuadro anterior, se realizó una serie de pruebas a menor escala; obteniendo lo siguiente:

TABLA 10
RESULTADOS EXPERIMENTALES DE BUFFER DE FOSFATOS

SOL.A (ml)	SOL.B(ml)	pH
9.3	0.7	6.07
9.5	0.5	5.85
9.7	0.3	5.64
9.8	0.2	5.45
9.9	0.1	5.03
10.0	0.0	4.55

NOTA: Todas las soluciones diluidas a 20 ml.

Con base en lo anterior, todas las soluciones buffer de fosfatos 0.1M preparadas posteriormente se hicieron de la siguiente forma:

485 ml de solución A + 15 ml de solución B + 500 ml agua

Teniendo por tanto durante la experimentación un valor de pH promedio de 5.62.

3.2 BUFFER DE ACETATOS

Al igual que en la preparación de buffer de fosfatos, en este caso se muestra el siguiente cuadro, para la preparación de una solución de buffer de acetatos 0.1M en base a las siguientes soluciones (6):



A: Solución de ácido acético 0.2M.

B: Solución de acetato de sodio 0.2M.

TABLA 11

RELACION DE SOLUCIONES PARA OBTENER BUFFER DE ACETATOS

X	Y	pH
49.3	3.7	3.6
44.0	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.0	30.0	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.5	5.2
8.8	41.2	5.4
4.8	45.2	5.6

Siendo la relación de ambas soluciones la siguiente:

X ml de A + Y ml de B, diluidos a un volumen total de 100 ml⁽⁵⁾.

Debido a que el buffer requerido para la técnica era de 0.05M se hicieron las siguientes pruebas previas a la preparación.



TABLA 12
RESULTADOS EXPERIMENTALES DE BUFFER DE ACETATOS

SOL. A (ml)	SOL. B (ml)	pH
0.1	5	5.56
4.8	0.2	5.20
4.7	0.3	5.02
4.6	0.4	4.91
4.12	0.88	4.43

NOTA: Todas las soluciones estan diluidas a 10 ml.

Posteriormente se preparó la solución de la siguiente forma:

9.38 ml de solución A + 460 ml de solución B + 469.38 ml de agua.

Dando como resultado soluciones con un pH promedio de 5.47.



4.- ECUACION DE MICHAELIS - MENTEN.

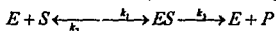
Como se mencionó, la cinética enzimática se basa en general en la ecuación que a continuación se presenta:

$$V = \frac{V_{\max} * S}{K_m + S}$$

En donde la constante de Michaelis (K_m) es la cantidad de sustrato que se requiere para que una enzima funcione a la mitad de su velocidad. Si se obtienen valores grandes para ella, significa que la enzima tiene poca afinidad con el sustrato y viceversa.

La velocidad máxima (V_{\max}) se obtiene al tener la enzima completamente saturada con sustrato.

La ecuación proviene de las siguientes consideraciones:



Siendo la constante k_3 la de mayor importancia.

$$\textcircled{1} V = k_3[ES]$$

$$\textcircled{2} E_{\text{total}} = E + ES$$

En donde:

E = enzima libre.

ES = enzima unida al sustrato.

De la cual:

$$\textcircled{3} E = E_{\text{total}} - ES$$

Y planteando a continuación:

$$\textcircled{4} \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] \quad \textcircled{5} -\frac{d[ES]}{dt} = [k_2 + k_3][ES]$$

Sustituyendo 3 en 4:

$$\textcircled{6} \frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E_{\text{total}} - ES]$$



Bajo la condición de estado estacionario, la velocidad con la que se forma ES es la misma con la que desaparece:

$$\bullet \frac{d[ES]}{dt} = -\frac{d[ES]}{dt}$$

Por lo tanto:

$$k_1[S][E_{total} - ES] = [ES][k_2 + k_3]$$

$$[S][E_{total} - ES] = [ES] \left[\frac{k_2 + k_3}{k_1} \right]$$

De la cual, la relación de las constantes de velocidad es englobada por la constante de Michaelis-Menten:

$$\bullet [S][E_{total} - ES] = [ES]Km$$

Reordenando:

$$[S][E_{total}] - [S][ES] = Km[ES]$$

$$[S][E_{total}] = Km[ES] + [S][ES]$$

$$\bullet [ES] = \frac{[S][E_{total}]}{Km + [S]}$$

Bajo condiciones de saturación, $V = V_{max}$ y $E_{total} = ES$; así que de la ecuación \bullet :

$$\bullet V_{max} = K_3 E_{total}$$

Y sustituyendo \bullet en \bullet :

$$V = \frac{K_3 E_{total} [S]}{Km + [S]}$$

Y sustituyendo esta última en \bullet , se genera la ecuación general:

$$V = \frac{V_{max} * S}{Km + S}$$