

## **PRÁCTICA 5. UTILIZACIÓN DE GLUCOSA ISOMERASA INSOLUBILIZADA Y CONTROL DE LA REACCIÓN POR POLARIMETRÍA Y POR MEDIDA ENZIMÁTICA DE LA GLUCOSA**

### **Introducción**

Se pretende estudiar el efecto del enzima glucosa isomerasa insolubilizado, de utilización industrial, sobre una solución de glucosa y sobre otra de fructosa. Se utiliza glucosa isomerasa de *Streptomyces rubiginosus*, en forma insolubilizada, suministrada por Genencor. El material está diseñado para ser utilizado empaquetado en columnas, y consecuentemente tiene como característica su gran resistencia mecánica y alta velocidad de flujo. El enzima requiere magnesio para ser activo (que debe ser añadido), y se inhibe por la presencia de calcio, por lo que debe utilizarse agua desionizada. A las temperaturas de trabajo, el enzima puede inactivarse por oxidación, por lo que es necesario añadir sulfito o bisulfito como antioxidante.

### **Disoluciones de azúcar**

Cada disolución de trabajo debe contener 100 g/l de azúcar, 400 mg/l de  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 130 mg/l de sulfito de sodio.

Utilizar 5 gramos de enzima insolubilizado seco (o 12,5 gramos de enzima insolubilizado rehidratado) y 40 ml de disolución de azúcar.

Incubar con el enzima insolubilizado en un baño de agua a 50°C, removiendo frecuentemente, a lo largo de una hora, tomando muestras a los intervalos señalados.

### **Muestras para el análisis enzimático**

De la disolución de fructosa incubada con el enzima, tomar muestras de 0.1 ml a los 5, 10, 20, 40, 60 y 90 minutos.

De la disolución de glucosa incubada con el enzima, tomar muestras de 0.1 ml a los 30 y 90 minutos.

Poner las muestras tomadas (0.1 ml), en un matraz aforado de 25 ml y diluirlas con agua destilada.

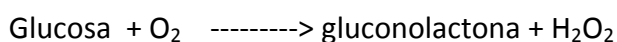
Para la medida enzimática posterior, se deberá tomar 0.1 ml de esa dilución, y añadir 0.4 ml de agua.

### **Análisis enzimático de la glucosa.**

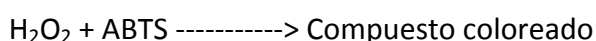
La glucosa se analizará utilizando un sistema enzimático con glucosa oxidasa y peroxidasa, con abts como reactivo final para colorimetría.

Las reacciones son:

Glucosa oxidasa



Peroxidasa



### Reactivo

El reactivo colorimétrico, con los dos enzimas y el sustrato, se compone de:

20 mg de ABTS

15 mg de peroxidasa de rábano

150 U de glucosa oxidasa

55 ml de tampón fosfato 0.1 M pH 6.0

Preparar en frasco de color topacio.

Patrones para la recta de calibrado:

5, 10, 20, 40, y 80 microgramos de glucosa por mililitro.

### Reacción colorimétrica

Poner en tubos de ensayo 0.5 ml cada patrón (o 0.1 ml de las muestras diluidas en matraz aforado y 0.4 ml de agua), y 1 ml de reactivo. Incubar 30 minutos a 37°C.

Medir en cubeta micro a 725 nm, teniendo cuidado de colocar correctamente la cubeta para que el paso óptico sea 1 centímetro.

### Análisis polarimétrico

Tras haber transcurrido la hora de incubación del enzima insolubilizado con los sustratos, separar el líquido con el azúcar disuelto, cuidadosamente, dejando el enzima insolubilizado en el matraz original. Filtrar los líquidos y enfriar hasta 20°C. En el polarímetro, utilizar la cubeta de un decímetro de paso óptico. Medir muestras de las disoluciones originales de glucosa y fructosa. Los valores obtenidos pueden servir para todos los grupos. Cada grupo debe medir ahora los valores de sus propias muestras, procurando que estén a una temperatura de unos 20 °C. Para el cálculo de la concentración se utiliza la ecuación

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{l \times c}$$

Donde  $\alpha$  es el ángulo medido, l el paso óptico en decímetros y c la concentración en gramos por ml,  $[\alpha]$  la rotación específica.

Rotaciones específicas de los azúcares en equilibrio:

$$[\alpha] \text{ D-fructosa} = -92,4$$

$$[\alpha] \text{ D- glucosa} = +52,7$$

En el caso de las medidas de las soluciones de partida, de concentración conocida, la ecuación debe ser coherente entre la concentración y el ángulo  $\alpha$  medido. Los valores de las rotaciones específicas son los que corresponden a las mezclas en equilibrio de las distintas conformaciones para cada azúcar.

Los valores de  $\alpha$  son aditivos, por lo que el ángulo medido en las muestras será la suma de los valores correspondientes a la glucosa y a la fructosa. Como la concentración total es en todos los casos 100 g/l, suma de la de una y de la de otra, se puede calcular la concentración de cada una



Si se utiliza enzima ya usado, hay que tener en cuenta que 5 gramos de enzima seco tienen 7,5 gramos de agua atrapada, y ese volumen de agua debe sumarse, como dilución en los cálculos, a los 40 ml de disolución añadidos.