

Obtención de un Extracto Enzimático de Glucosa Oxidasa y Catalasa con Potencial Antioxidante en Alimentos, en un Medio de Cultivo no Convencional

Luis Ojeda*, Nirza Noguera, Juana Ledia Triana y Francisco Triana-Alonso (†)

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Maracay-Venezuela. Apartado Postal 2351.

E-mail: luis_ojedaojeda@yahoo.es

RESUMEN

Las enzimas glucosa oxidasa (GOD) y catalasa (CAT) son usadas como aditivos para la conservación de alimentos, ya que favorecen la eliminación del oxígeno residual después del envasado. El hongo *Aspergillus niger* es una fuente muy utilizada para la obtención de las enzimas, porque posee una serie de ventajas biotecnológicas, no es patógeno y crece sobre una variedad de fuentes nutricionales. En el presente estudio, se aisló un extracto con actividad de GOD/CAT de *A. niger*, usando como medios de cultivo sustratos complejos de bajo costo y de fácil adquisición (nitrato de amonio fertilizante y azúcar industrial). El crecimiento celular se llevó a cabo en biorreactores de 5 L a 30°C durante 36 h, variando la velocidad de agitación (200, 250 y 300 rpm). El mayor rendimiento y estabilidad se obtuvo con la velocidad de agitación más alta. Los caldos de fermentación fueron recuperados por filtración, luego precipitados con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y resuspendidos para someterlos a una cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-25. La incorporación de la mezcla GOD/CAT a un sistema alimenticio, promovió el descenso del oxígeno disuelto (OD) en forma dosis dependiente (129 mg/L remueven 99% OD en 107 s). Los resultados mostraron que el extracto GOD/CAT de *A. niger* tuvo buena actividad y estabilidad y podría ser utilizado como aditivo para la conservación de alimentos.

Palabras Clave: *Aspergillus niger*, glucosa oxidasa, catalasa, antioxidante natural.

ABSTRACT

The enzymes glucose oxidase (GOD) and catalase (CAT) are used as additives for food preservation, because they promote the elimination of residual oxygen after packaging. The fungus *Aspergillus niger* is a widely used source for obtaining GOD/CAT, since it has many

biotechnological advantages, it is not pathogenic and can grow in a wide variety of nutrition sources. In this study we used this fungus to obtain an extract with activity of GOD/CAT. The culture medium was prepared with complex substrates of low cost and easy acquisition (ammonium nitrate and industrial sugar). Cell growth was carried out in bioreactors of 5 L at 30°C for 36 h, varying the stirring speed (200, 250 and 300 rpm). The highest yield and activity were obtained with 300 rpm. The fermentation broth was recovered by filtration, precipitated with (NH₄)₂SO₄, resuspended and desalted by molecular exclusion chromatography in Sephadex G-25. The addition of the mixture GOD/CAT to a food system, promoted the decrease in the amount of dissolved oxygen (DO) in a dose-dependent manner (129 mg/L removed 99% OD/107 s). The results show that the *A. niger* GOD/CAT extract has good activity and stability and could be used as an additive for food preservation.

Key words: *Aspergillus niger*, glucose oxidase, catalase, natural antioxidant.

INTRODUCCIÓN

En el campo de la microbiología industrial, es común encontrar investigaciones centradas en la búsqueda de materiales alternativos o no convencionales para la formulación de medios de cultivo, así como, el establecimiento de protocolos que permitan la fácil recuperación de los metabolitos producidos, sin pérdida de su actividad biológica. Esto no es casualidad, puesto que la etapa de elaboración de los medios de cultivo, junto con el proceso de extracción y purificación de metabolitos de origen microbiano, tiene importancia económica, pueden representar alrededor del 60% de los costos de producción (Scragg, 2004).

Aspergillus niger es un hongo filamentoso muy utilizado a nivel biotecnológico por sus ventajas: producción de gran diversidad de metabolitos, alta capacidad de excreción de metabolitos ubicándolo como exportador de una gran cantidad de proteínas homólogas,

baja frecuencia de mutación, condiciones de cultivo fácilmente ajustables en cuanto a temperatura y requerimientos de agitación y aireación, adaptabilidad a diversas fuentes nutricionales y sus productos son considerados como seguros por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA: Food and Drug Administration) para el consumo humano y animal (El-Enshasy, 1998; Villena & Gutiérrez, 2003).

En la actualidad, *A. niger* es muy usado para la producción de enzimas propias y proteínas foráneas, dada su capacidad de exportación y de llevar a cabo los procesos de modificación postraduccional, como la glucosilación (El-Enshasy, 1998; Parra *et al.*, 2004). Dentro de la amplia gama de enzimas producidas por este hongo, se pueden destacar celulasas, hemicelulasas, amilasas, pectinesterasas, glucosa oxidasa y la catalasa, las cuales son muy utilizadas en la industria de alimentos (Schuster *et al.*, 2002).

La glucosa oxidasa (GOD; EC 1.1.3.4) y la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6), se han utilizado en productos alimenticios procesados, esencialmente para mejorar la vida útil y mantener la estabilidad del sabor y de color durante el almacenamiento. La GOD cataliza la oxidación de β -D-glucosa a D-glucono-1,5-lactona y H_2O_2 (Meyer & Isaksen 1995), mientras que la CAT cataliza la descomposición del H_2O_2 remanente de la reacción anterior (Frost & Moss 1987). En consecuencia el sistema enzimático puede ofrecer dos tipos de protección para los alimentos. Los alimentos que sufren deterioro por la presencia de la glucosa (reacción del Maillard) son protegidos por la oxidación de este sustrato. Cuando el oxígeno puede ocasionar la oxidación (decoloración, rancidez, inestabilidad del sabor), es consumido durante la acción catalítica acoplada de ambas enzimas (Ojeda, 2009).

Entre las aplicaciones específicas en la industria de alimentos, de este sistema enzimático se pueden destacar: en la industria vinícola, para prevenir el oscurecimiento de los vino durante su almacenamiento (Ouhg, 1975; Gómez, 1995), para remover glucosa de la clara de huevo (Kamalrookh *et al.*, 1994), para eliminar el oxígeno disuelto de aderezo para ensaladas (Mistry & Min, 1992), estudiar la susceptibilidad oxidativa de la mayonesa (Isaksen & Adler-Nissen, 1997), como aditivo para mantener la estabilidad del concentrado del aroma del mango (Ramteke & Eipeson, 1997), para evitar el oscurecimiento de puré

de manzanas (Parpinello *et al.*, 2002), entre otros.

Las condiciones de cultivo, así como las fuentes nutricionales utilizadas para el crecimiento del hongo, condicionan la producción de sus metabolitos. Es conocido que para la producción de estas enzimas, es indispensable la presencia de glucosa en el medio de cultivo, ya sea en estado puro o como unidad estructural de polisacáridos usados como fuentes de carbono más complejas. También se han descrito requerimientos de nitrógeno, fósforo y trazas de otros elementos como el magnesio y calcio, los cuales son generalmente incorporados como sales inorgánicas y/o materiales orgánicos. En lo referente a las condiciones físico-químicas para la incubación, *A. niger* hay que asegurar el suministro de aire, bajo agitación continua para favorecer la excreción de las enzimas; a temperaturas entre 25 y 35°C; y los valores de pH entre 5 y 7 (Hatzinikolaou & Macris, 1995; El-Enshasy, 1998). Se ha demostrado que la agitación es un factor crítico y que debe ajustarse de acuerdo a los metabolitos de interés (El-Enshasy *et al.*, 2006).

Con base a esta información y para incorporar fuentes nutricionales no convencionales para el cultivo del hongo, en esta investigación se utilizó un medio elaborado con azúcar industrial y nitrato de amonio fertilizante. Los cultivos se realizaron bajo tres condiciones de agitación, para determinar a cual velocidad se alcanzaba un máximo de la producción de ambas enzimas.

El caldo obtenido fue purificado parcialmente y fue incorporado a un sistema alimenticio para evaluar su capacidad antioxidante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Se utilizó una cepa silvestre de *A. niger*, donada por el Dpto. de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Carabobo Maracay-Venezuela, obtenida a partir de un aislado clínico.

Cultivo de A. niger

Los cultivos se realizaron en un biorreactor de 5 L (New Brunswick, Modelo Bioflo 2000). Se usó un medio a base de azúcar industrial y fertilizante, con la siguiente formulación por litro: azúcar industrial 15 %, nitrato de amonio grado fertilizante 0.2 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 %, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.7 %, K_2HPO_4 1.2 %, KH_2PO_4 0.7 % y cloranfenicol (20 $\mu g/mL$). La inoculación se hizo a partir de suspensiones de esporas a razón de 2.5×10^5 esporas/mL y las condiciones de incubación fueron pH inicial 7; temperatura 30°C, con suministro de aire a razón de 2 L/min, bajo agitación (200, 250 y 300 rpm) durante 36 h. Estos ensayos se realizaron por triplicado para cada condición. Finalmente, los caldos de cultivo se recuperaron mediante filtración para separar el micelio y realizar el proceso de extracción y purificación de las enzimas extracelulares.

Extracción y purificación de las enzimas

Para la extracción se utilizó sulfato de amonio al 80% de saturación, el cual fue incorporado a los caldos de cultivo en condiciones de baja temperatura (4°C), bajo agitación continua (Zoghbi *et al.*, 2008). La mezcla se dejó en reposo durante 12 h a 4°C y las enzimas se recuperaron mediante centrifugación a 6600xg por 30 min. Los sedimentos obtenidos se resuspendieron en Tris-HCl (pH 7.5) 20 mM, NaCl 350 mM, glicerol al 2% hasta un volumen final de 4 mL y se desalinizaron mediante una cromatografía de exclusión molecular en columna (20 x 2 cm) de Sephadex G-25 equilibrada con buffer (Tris-HCl 20 mM pH=7.5; NaCl 350 mM) a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min, colectando fracciones de 3 mL. Las fracciones con alta actividad de glucosa oxidasa y catalasa fueron concentradas mediante ultra filtración con una membrana de corte 15000 (FISHER Cientific), hasta reducir el volumen inicial en un 90%.

Determinación de actividad para Glucosa Oxidasa

Se evaluó mediante la detección del peróxido de hidrógeno producido al oxidarse la glucosa (sustrato), por el método colorimétrico descrito por Trinder (1969), con la sustitución de la o-dianisidina por 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), en vista de que este último posee un menor efecto cancerígeno y mutagénico (Yamaguchi *et al.*, 2001). Los componentes de la mezcla de

reacción, todos disueltos en tampón de fosfato 50 mM (pH 7) fueron: TMB 0.4 g/L oxigenado (Pierce © 34021); peroxidasa 0.43 g/L (Sigma P 4794); D-glucosa al 18% (Sigma G 8270) y muestras con una estimación proteica entre 0.1 – 0.2 µg. Se midió la actividad con base al cambio de absorbancia a 450 nm de la mezcla, utilizando el espectrofotómetro Beckman Du 650 y la unidad de actividad (U) fue definida como la cantidad de glucosa oxidasa que cataliza la oxidación de 1 µmol de D-glucosa por minuto a pH 7 y a 25°C.

Determinación de actividad enzimática Catalasa

Se empleó el método reportado por Nicholls & Schonbaum (1963), el cual se basa en la medición directa de la disminución de la absorción de la luz en la región ultravioleta (240 nm) como consecuencia de la descomposición de H₂O₂ por la catalasa. La mezcla de reacción fue la siguiente: 0.02 M de buffer fosfato (pH 7), 0.25 mM de H₂O₂ y un estimado de 0.1 a 0.2 µg de proteínas presentes en las fracciones a evaluar. La actividad se determinó sobre la base del cambio de la absorbancia a 240 nm a intervalos de 1 min a 25°C en el espectrofotómetro Beckman Du 650. Y se definió la unidad de actividad como la cantidad de enzima catalasa que cataliza la descomposición de un µmol de H₂O₂ a pH 7 y a 25°C.

Capacidad Antioxidante

Para evaluar la capacidad antioxidante de la mezcla se diseñó un ensayo para determinar el consumo de oxígeno disuelto en un néctar. Se preparó un néctar de manzana siguiendo las normas de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) con las siguientes características: 30% de pulpa, 70% de agua, 15% de sacarosa, sin aditivos. Seguidamente se tomaron muestras para incorporarle diferentes concentraciones del extracto enzimático que resultó con la mayor actividad catalítica de ambas enzimas, se incorporó a razón de 16, 32, 64 y 129 mg/L y se determinó la capacidad antioxidante de acuerdo a la metodología planteada por Parpinielo *et al.* (2002). Se empleó un medidor de oxígeno disuelto marca WPA modelo CD 500 meter.

Análisis estadístico

Durante el desarrollo de los cultivos se tomaron muestras para evaluar el crecimiento e incremento de la actividad. Estas muestras fueron sometidas a un análisis de varianza para evaluar si existían diferencias significativas, relacionadas con las condiciones de cultivo. Para evaluar la actividad enzimática de los extractos obtenidos bajo las 3 condiciones de agitación, se realizaron por duplicado. Se obtuvieron un total de 18 datos, los cuales fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias para determinar la mejor respuesta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones de cultivo y producción de GOD y CAT

Durante el cultivo celular se tomaron muestras para monitorear el crecimiento del hongo (biomasa, pH y actividad de GOD). Se encontró que el aumento en la velocidad de agitación durante la incubación, afectó positivamente el crecimiento y la producción de GOD. Los cultivos bajo una velocidad de agitación de 300 rpm (Fig. 1C), exhibieron un mayor incremento de biomasa, un descenso más marcado del pH y una actividad enzimática significativamente mayor ($p < 0.05$), alcanzando valores por encima de 1 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$. En las otras dos condiciones, no superaron los 0.5 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ de actividad (Fig. 1A y 1B).

En los extractos crudos no se determinó la actividad de CAT puesto que, datos reportados por otros investigadores (Mischak *et al.*, 1985; Muller, 1986; Witteveen *et al.*, 1992 con cepas y medios de cultivo diferentes), han demostrado que la síntesis de ambas enzimas ocurre de manera simultánea durante las primeras horas de crecimiento. Por esta razón y para ahorrar tiempo y materiales, la actividad de CAT sólo se determinó en los extractos sometidos al proceso de purificación.

Estos resultados concuerdan con lo indicado por El-Enshay *et al.* (2006), quienes concluyeron que la velocidad de agitación es un factor determinante en el crecimiento de este hongo y la síntesis de enzimas

extracelulares. Aunque estos autores probaron un rango de variación mucho más alto (200 – 800 rpm), en la presente investigación se demostró que a 300 rpm hubo un efecto notablemente significativo y correspondiente a un incremento alrededor de tres veces de la actividad recuperada con respecto a los cultivos agitados a 200 y 250 rpm.

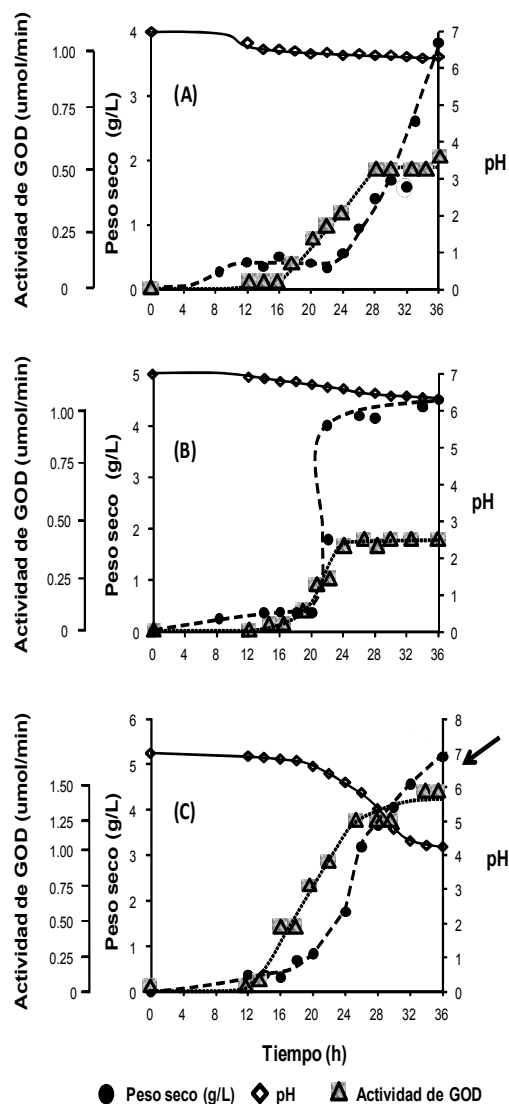


Fig. 1. Curvas de crecimiento de *A. niger* para las tres condiciones de agitación. (A) 200 rpm, (B) 250 rpm y (C) 300 rpm. La flecha en (C) indica una mayor producción de biomasa y de actividad en el extracto crudo.

El aumento de la velocidad de agitación produce un incremento en la concentración de oxígeno disuelto en el medio provocando una tasa de crecimiento más rápida para el micelio (Zetelaki & Vas, 1968; Zetelaki, 1970). Al mismo tiempo, es conveniente destacar que la actividad en los cultivos de *A. niger* con aireación fue superior a la encontrada en los cultivos poco-oxigenados. Por lo tanto, el suministro de oxígeno a los microorganismos es un parámetro clave, ya que esta molécula al ser sustrato de la GOD, la velocidad de reacción dependerá de su concentración en el sistema obedeciendo a una cinética de segundo orden (Fierdurek & Gromada, 2000; Miron *et al.*, 2002). Adicionalmente induce la expresión de esta oxidasa (Witteveen *et al.*, 1992).

Extracción y purificación

Los extractos crudos obtenidos al final de los cultivos (36 h), fueron sometidos al proceso de precipitación con sulfato de amonio y filtración molecular; a las fracciones obtenidas de las cromatografías se les midió la actividad enzimática de ambas enzimas (Fig. 2). La catalasa, de acuerdo a su peso molecular de 240 kDa, eluyó en las primeras fracciones de elución, en estas se observó la mayor actividad. En las fracciones siguientes se detectó la disminución de CAT y el aumento progresivo de la actividad de GOD (Pm = 160 kDa) hasta alcanzar un máximo, para disminuir luego a valores residuales. Una mayor velocidad de agitación durante el desarrollo del cultivo, permitió recuperar

mayores niveles de actividad de ambas enzimas. En las condiciones de 250 y 300 rpm (Fig. 2B y 2C) la actividad recuperada de CAT resultó entre 2 y 3.5 veces superior a la obtenida a partir del cultivo a 200 rpm (Fig. 2A);

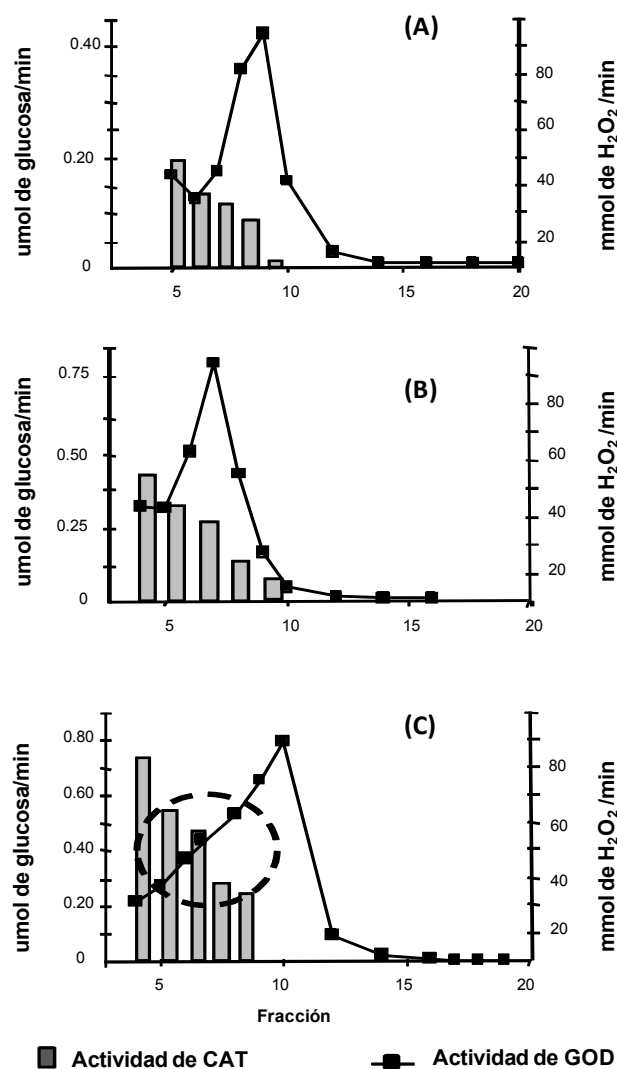


Fig. 2. Recuperación de la actividad de la GOD y la CAT por cromatografía en Sephadex G-25. (A) 200 rpm, (B) 250 rpm y (C) 300 rpm. El círculo en (C) indica una mayor actividad de GOD y CAT.

mientras que la actividad de GOD se incrementó en 1.5 veces. Estos resultados permitieron concluir que la mejor condición para la producción de ambas enzimas fue 300 rpm. En consecuencia, las fracciones con alta actividad de GOD/CAT provenientes de las cromatografías bajo esta condición de cultivo (Fig. 2C), fueron unidas y concentradas por ultrafiltración antes de realizar los ensayos para evaluar su capacidad antioxidante.

Capacidad antioxidante

Para el análisis de la capacidad antioxidante de la mezcla GOD/CAT se midió el consumo de oxígeno disuelto (OD) en un preparado de jugo de manzana, después de incorporarle el extracto purificado, proveniente de los cultivos a 300 rpm. En la figura 3-A se puede observar que el consumo de oxígeno aumentó progresivamente a medida que se incrementó la concentración de extracto enzimático adicionado,

alcanzando valores cercanos al 100% de eliminación para 129 mg/L de la mezcla GOD/CAT en un tiempo de 107 s. Se usó en el ensayo un control con ácido ascórbico como antioxidante y se observó que la cantidad de OD no disminuyó en el tiempo y condiciones utilizadas. En la figura 3-B se representó la velocidad de consumo de oxígeno frente a la concentración de extracto enzimático. En ésta se observó una tendencia de saturación a una concentración de extracto superior a 120 mg/L donde la velocidad fue dependiente de la cantidad de oxígeno disuelto. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Parpinello *et al.* (2002), en el análisis realizado sobre el oscurecimiento de puré de manzana usando una mezcla comercial de GOD/CAT. En dicha investigación, se detectó la remoción aproximada del 99% del OD en 120 s usando una concentración de 100 mg/L de extracto enzimático y no observaron disminución de oxígeno con ácido ascórbico. En este

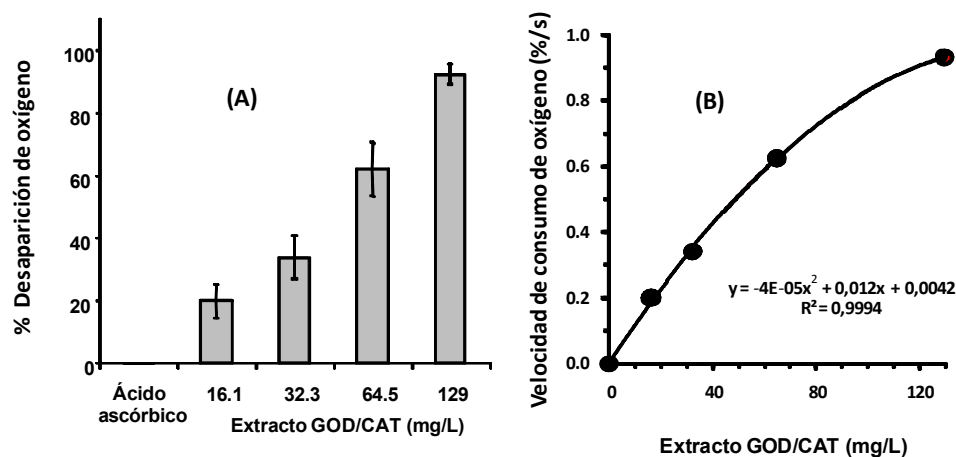


Fig. 3. Efecto del extracto GOD/CAT sobre el oxígeno disuelto en un néctar de manzana: (A) Porcentaje de desaparición del oxígeno en un tiempo de 107 s para muestras con extracto GOD/CAT y muestras con antioxidante químico (ácido ascórbico). (B) Cinética del consumo de oxígeno de las diferentes concentraciones del extracto.

estudio, una concentración de 129 mg/L de la mezcla GOD/CAT eliminó aproximadamente el 99% del OD en 107 s, considerándose una taza de alta efectividad en el sistema GOD/CAT obtenido. El análisis de dobles recíprocos reveló que la velocidad máxima teórica se encuentra alrededor de 1.8 % de consumo de OD/s (no mostrado), muy superior a otros valores reportados (Parpinello *et al.*, 2002). También se puede observar que con la mínima adición de

CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que se puede obtener un extracto con buenas actividades de glucosa oxidasa y catalasa a partir del hongo *Aspergillus niger* cultivado en un medio de bajo costo y fácil adquisición. Los resultados de la capacidad antioxidante del extracto obtenido de GOD/CAT, sobre el néctar de manzana, sugieren que dicho extracto tiene potencial como preservante en la industria de alimentos.

REFERENCIAS

- El-Enshasy H, Kleine H & Rinas U (2006) Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. *Process Biochem.* 41: 2103-2112.
- El-Enshasy H (1998) Optimization of glucose oxidase production and excretion by recombinant *Aspergillus niger*. Tesis doctoral presentada en la Facultad de Ciencias de la Universidad Técnica Carolo-Wilhelmina en Brunswick, Alemania. 161 p.
- Fiedurek J & Gromada A (2000) Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *Appl. Microbiol.* 89: 85-89.
- Frost M & Moss D (1987) Production of enzymes by fermentations. *In: Biotechnology* vol. 7. Rehm HJ & Reed G (ed). pp. 421-457.
- Gomez E, Martinez A & Laencina J (1995) Prevention of oxidative browning during wine storage. *Food Res. International.* 28(30): 213-217.
- Hatzinokolaou D & Macris B (1995) Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Technol.* 17: 530-534.
- Isaksen A & Adler-Nissen J (1997) Antioxidative Effect of glucose oxidase extracto GOD/CAT utilizada en este estudio (16 mg/L) se alcanza una velocidad de consumo de oxígeno (0.2 %/min) que permitiría eliminarlo por completo de la muestra ensayada en menos de 10 min. Por lo tanto, considerando la estabilidad de las actividades enzimáticas obtenidas (resultados no mostrados), el extracto enzimático obtenido tendría suficiente eficiencia como aditivo antioxidante en alimentos envasados aún a concentraciones inferiores.

- and catalase in mayonnaises of different oxidative susceptibility. II. mathematical modelling. *Lebensm. Wiss. Technol.* 30 (8): 847-852.
- Kamalrookh Z & D'Souza S (1994) Removal of glucose from hen egg using glucose oxidase and catalase co-immobilized in hen egg white foam matrix. *J. Food Sci. Technol.* 31(2): 153-155.
- Meyer AS & Isaksen A (1995) Application of enzymes as food antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 300-304
- Mischak H, Kubicek C & Röhr M (1985) Formation and location of glucose oxidase in citric acid producing mycelia of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 21: 27-31.
- Miron J, Gonzalez M, Pastrana I & Murado M (2002) Diauxic production of Glucose Oxidase by *Aspergillus niger* in submerged culture a dynamic model. *Enzyme Microb Technol.* 31: 615-20.
- Mistry B & Min DB (1992) Redution of dissolved oxygen in model salad dressing by glucose oxidase-catalase dependent on pH and temperature. *J. Food Sci.* 57(1): 196-199.
- Mueller H (1986) Utilization of gluconate by *Aspergillus niger*. Al enzymes of degradation pathways and main and end product. *Zentralbl Mikrobiol.* 141: 461-69.
- Nicholls P & Schonbaum G (1963) The enzymes vol III. Academic press, N.Y. 147 p.
- Ojeda L (2009) Obtención de extractos de las enzimas glucosa oxidasa y catalasa a partir del cultivo del *Aspergillus niger* y medir su potencial como aditivo para la conservación de alimentos. Tesis de maestría en ingeniería agroindustrial. Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora. Venezuela.
- Ough CS (1975) Further investigations with glucose oxidase-catalase enzyme systems for uses with wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 26(1): 30-36.
- Parpinello G, Chinnici F, Vesari A & Riponi C (2002) Preliminary study on glucose oxidase-catalase enzyme system to control the browning of apple and pear pures. *Lebensm- Wiss u-Technol.* 35(3): 239-243.
- Parra R, Aldred D, Archer D & Magana N (2004) Water activity, solute and temperature modify growth and spore production of wild type and genetically engineered *Aspergillus niger* strains. *Enzyme Microb. Technol.* 35: 232-237.
- Ramteke R & Eipeson W (1997) Effect of additives on the stability of mango aroma concentrate during storage. *J. Food Sci Technol.* 34(3): 195-199.
- Schuster E, Dunn-Coleman N & Frisvad J (2002) On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 426-435.
- Scragg A (2004) *Bioteconología para Ingenieros*. Ed. Limusa, S.A. Noriega Editores. México.
- Trinder P (1969) Determination of blood glucose using an oxidase peroxidase

- system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin. Pathol.* 22:158-61.
- Villena G & Gutiérrez M (2003) Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Rev. Peru. Biol.* 10(1): 78-87.
- Witteveen C, Veenhuis M & Visser J (1992) Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1190 – 1194.
- Yamaguchi M, Inoue H, Chikuma T, Itoh J, Makino Y & Hojo H (2001) A rapid enzyme immunoassay for cocaine and benzoylecgonine using glucose oxidase. *J Health Sci*; 47: 419-423.
- Zetelaki K & Vas K (1968) The role of aereation and agitation in the production of glucose oxidase in submerged culture. *Biotechnol. and Bioengineer.* 10: 45-59.
- Zetelaki K (1970) The role of aereation and agitation in the production of glucose oxidase in submerged culture II. *Biotechnol. and Bioengineer.* 12: 379-397.
- Zoghbi N, Ojeda L, Noguera N, Yépez A, Camargo H & Triana-Alonso F (2008) Extracción y purificación de glucosa oxidasa para fines diagnósticos producida en medios a base de fertilizantes y azúcar industrial. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 28: 31-37.