



Determinación de la actividad enzimática de α -amilasa, glucoamilasa, celulasa, pululanasa y pectinasa a partir de los métodos de Street Close y dinitrosalicílico (DNS)

Ortiz López, Daniel José

Fundación Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial

<https://orcid.org/0000-0002-6556-0637> djortizlopez76@gmail.com

ASA/Artículo

doi: <http://doi.org/10.5281/zenodo.17464461>

Recibido: 11-11-2024

Aceptado: 12-06-2024

RESUMEN

Las enzimas son aquellas proteínas responsables de disparar, modificar, detener, acelerar o ralentizar determinadas reacciones químicas, concretamente aquellas que son termodinámicamente posibles. En otras palabras, son las sustancias que se encargan de regular el cuerpo de los seres vivos. La actividad enzimática puede verse afectada por diversos factores, como temperatura, pH y concentración. Las enzimas funcionan mejor dentro de rangos de temperatura y de pH específicos, y bajo condiciones que no son las óptimas una enzima puede perder su capacidad de unirse a un sustrato. En este sentido, el objetivo principal de esta investigación consistió en evaluar la actividad enzimática de un grupo de enzimas comerciales pertenecientes al laboratorio experimental de la división de Biotecnología de la Fundación CIEPE. Entre las que destacan: α -amilasas, glucoamilasas, pectinasa, pululanasa y celulasa. Cada una de estas enzimas fue evaluada su actividad por los métodos: Street Close y Dinitrosalicílico o DNS. Este último, permite cuantificar la producción de glucosa por espectrofotometría a través del tiempo como medida de la actividad enzimática para cada una de las enzimas evaluadas. A través de estos métodos se pudo comprobar que las mismas, presentan actividad enzimática óptima para ser empleados en diferentes actividades exploratorias.

Palabras clave: Enzima, Actividad enzimática, Biotecnología.



Determination of the enzymatic activity of α -amylase, glucoamylase, cellulase, pullulanase, and pectinase using the street-close and dinitrosalicylic acid (DNS) methods

ABSTRACT

Enzymes are proteins responsible for triggering, modifying, stopping, accelerating, or slowing down certain chemical reactions, specifically those that are thermodynamically possible. In other words, they are the substances responsible for regulating the functioning of living organisms. Enzymatic activity can be affected by various factors, such as temperature, pH, and concentration. Enzymes function best within specific temperature and pH ranges, and under suboptimal conditions, an enzyme can lose its ability to bind to a substrate. The main objective of this research was to evaluate the enzymatic activity of a group of commercial enzymes belonging to the experimental laboratory of the Biotechnology Division of the CIEPE Foundation. These include α -amylases, glucoamylases, pectinase, pullulanase, and cellulase. The activity of each of these enzymes was evaluated using the Street Close and Dinitrosalicylic acid (DNS) methods. The latter allows glucose production to be quantified by spectrophotometry over time as a measure of enzymatic activity for each of the enzymes evaluated. These methods demonstrated that each enzyme exhibited optimal enzymatic activity for use in various exploratory activities.

Keywords: Enzyme, Enzymatic Activity, Biotechnology.

INTRODUCCION

Los cambios químicos que se verifican en los seres vivos ofrecen la extraordinaria particularidad de efectuarse, casi en su totalidad, por la acción activadora de catalizadores específicos denominados enzimas. Las enzimas son catalizadores orgánicos producidos en los seres vivos y capaces de funcionar fuera de la célula u organismo que los producen (Ramírez y Ayala, 2014).

Una parte importante del estudio de la bioquímica está, hoy día, dedicado a las enzimas, puesto que todas las funciones fisiológicas, como por ejemplo la contracción muscular, la conducción de los impulsos nerviosos, la excreción por el riñón, la respiración, etc., están íntimamente unidas a la acción de las enzimas.

Muchas de estas reacciones han sido estudiadas como sistemas aislados con enzimas cristalinas puras, y por ello, la enzimología tiene como objetivo reproducir *in vitro* los cambios que ocurren en los diferentes órganos, tejidos, etc., del organismo, no existe prácticamente en la célula

reacción alguna que no esté catalizada por las enzimas.

La amilasa, es una enzima hidrolasa que tiene la función de catalizar la reacción de hidrólisis de los enlaces 1-4 entre las unidades de glucosa al digerir el glucógeno y el almidón para formar fragmentos de glucosa (dextrinas, maltosa) y glucosa libre. En los animales se produce principalmente en las glándulas salivales (sobre todo en las glándulas parótidas) y en el páncreas. Tiene actividad enzimática a un pH de 6,4-7. El pH óptimo de la amilasa salival es de 6.9. Prácticamente todos los seres vivos disponen de amilasas.

La β -amilasa otra forma de amilasa, es también sintetizada por bacterias, hongos y plantas. Actúa desde el extremo no reductor de la cadena, catalizando la hidrólisis del segundo enlace α -1,4, rompiendo dos unidades de glucosa (maltosa) a la vez. La amilasa presente en el grano de cereal es la responsable de la producción de malta. Muchos microorganismos también producen amilasa para degradar el almidón extracelular. Los tejidos animales no contienen β -amilasa, aunque puede estar presente en microorganismos saprofitos del tracto gastrointestinal.

Industrialmente la hidrólisis del almidón se realiza por métodos enzimáticos o con soluciones de ácidos, como el ácido clorhídrico o sulfúrico, y se aplica calor para facilitar el rompimiento de los enlaces glucosídicos. En el método enzimático se utilizan alfa amilasa, beta amilasa, amiloglucosidasa, pululanasa y fosforilasa; obteniéndose productos como jarabes, mezcla de dextrinas, maltosa, glucosa y almidón modificado. Esta modificación da como resultado que el almidón forme geles de gran claridad y muy fuertes, y soluciones de menor viscosidad (Reyna et al. 2004).

En la etapa de licuefacción o dextrinización empleando la enzima alfa amilasa por ejemplo la Termamyl (120L), que es un preparado enzimático líquido y concentrado a base de α -amilasa termoestable, producida a partir de una cepa de *Bacillus licheniformes*, se hidrolizan los enlaces glucosídicos α -1,4 al azar de la amilosa y la amilopectina, convirtiendo el almidón en dextrinas y oligosacáridos solubles. Estas enzimas producen jarabes con Equivalentes de Dextrosa (ED) entre 15-25 %, la mayoría trabajan óptimamente a pH entre 5,5-7 y son termoestables (trabajan de 85- 95°C), aunque resisten temperaturas de hasta 130°C.

Una de las enzimas muy utilizadas es la AMG 300 L, que es una amiloglucosidasa producida a partir de una cepa seleccionada de *Aspergillus niger*, es clasificada como una exoenzima y denominada industrialmente como enzima sacarificante. Dicha enzima hidroliza tanto los enlaces α -1,4 como α -1,6 del almidón licuificado, por lo tanto, convierte a las dextrinas en glucosa o dextrosa. El pH óptimo de acción enzimática está entre 4-4,5 y la temperatura de 58-60°C.

Por otro lado, las celulasas juegan un papel muy importante en diferentes industrias como la textil, la de detergentes y la alimentaria, además de su utilización para la producción de bioetanol. Los recientes logros en bioconversión de desechos agrícolas e industriales en productos químicos han proporcionado diversos estudios sobre la producción de estas enzimas, aunque un gran número de microorganismos es capaz de degradar la celulosa, solo unos pocos pueden producir cantidades significativas de enzimas libres que hidrolizan completamente la celulosa in vitro.

Los hongos son los principales microorganismos productores de celulasas, aunque se han identificado también algunas bacterias y actinomicetos. Los hongos son responsables de la mayor proporción de celulasas en la naturaleza y

su primacía no es solamente consecuencia de la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos, sino que también tienen ventajas adaptativas como son: la rápida colonización de los sustratos y una eficiente remoción de los productos de hidrólisis. Estas características los distinguen de los demás organismos como los principales degradadores de materiales celulósicos. Actualmente la mayoría de las celulasas comerciales son producidas por especies de *Trichoderma* y *Aspergillus*.

Las pectinasas son un conjunto de enzimas que hidrolizan la pectina, están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son producidas por vegetales, frutas y microorganismos (hongos y bacterias). Estas enzimas presentan una extensa aplicación en la industria alimentaria, siendo utilizadas principalmente en la obtención de pulpas, jugos, vinos y cervezas (Beltrán et al. 2007).

Las pululanastas también denominadas α -dextrin 6-glucanohidrolasa, dextrinasa límite, pululano 6-glucanohidrolasa o amilopectina 6-glucanohidrolasa son enzimas que degradan pululano y pertenecen a las glucósido hidrolasas. Están ampliamente distribuidas en animales, plantas, hongos, levaduras y bacterias, siendo

estas últimas la principal fuente de estas enzimas (Hii et al. 2012). Son enzimas extracelulares desramificantes cuyos pesos moleculares varían de 45 a 225 kDa (Nisha y Satyanarayana, 2016) y generan, por bioconversión del almidón, diversos productos que presentan importantes aplicaciones en las industrias farmacéutica, química y alimentaria (Domań-Pytka y Bardowski, 2004). Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, la presente investigación tuvo como propósito fundamental la determinación de la actividad enzimática de un lote de enzimas pertenecientes al laboratorio experimental de la división de Biotecnología de la Fundación CIEPE.

Los métodos empleados (Amiloclásico o Street Close y Miller o DNS), se fundamentaron en la cuantificación de la producción de glucosa en el tiempo a partir de la hidrólisis enzimática de diferentes sustratos como almidón, pectina, maltodextrina y celulasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras seleccionadas:

Se seleccionó un lote de enzimas comerciales pertenecientes al laboratorio experimental de la

división de Biotecnología de la Fundación CIEPE. Entre las que destacan: α -amilasas, glucoamilasas, pectinasa, pululanasa y celulasa. Cada una de estas enzimas fue evaluada su actividad por los métodos: Street Close y Dinitrosalicílico o DNS. Este último, permite cuantificar la producción de glucosa por espectrofotometría a través del tiempo como medida de la actividad enzimática para cada una de las enzimas evaluadas.

Métodos enzimáticos empleados

Determinación de Azúcares reductores por espectrofotometría UV (Método de Ácido Dinitrosalicílico)

Los azúcares reductores poseen un grupo carbonilo libre formando un grupo hemiacetal que le confiere la característica de poder reaccionar con otros compuestos. El método de Miller o DNS (Ácido dinitrosalicílico) como reactivo tiene la capacidad de oxidar los azúcares reductores mostrando un comportamiento diferencial hacia mono y disacáridos, dando resultados colorimétricos que se pueden medir con una longitud de onda de 575 nm.

Fundamento:

En disolución alcalina el azúcar se hidroliza produciendo un compuesto que se reduce a un grupo nitro del DNS, para dar el producto monoamino correspondiente.

Preparación del reactivo DNS

Se preparó según el método propuesto por Coughan y Moloney. Se añade 10 g de Ácido Dinitrosalicílico (DNS) y 300 g de Tartrato de Sodio y Potasio (Sal de Rochelle) a 800 ml de NaOH 0,5 N y se calienta suavemente para disolver los reactivos. El volumen se completa hasta un litro con agua destilada.

Preparación de las soluciones patrón de glucosa para la curva de calibración

Se preparó la solución patrón de glucosa con las siguientes concentraciones: 0; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 1,7, y 2,0 g/L. Se añadieron 0,25 mL de cada solución y 0,25 mL del reactivo DNS en tubos tapa rosca cubiertos con papel aluminio para proteger la reacción de la luz. Los tubos se colocaron en un baño termostático a 92 °C por cinco minutos. Se detuvo la reacción por enfriamiento por cinco minutos y se agregó 2,5 ml de agua destilada a cada tubo, se agitó y se

realizó la lectura de la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro. El Cuadro 1 muestra en resumen las cantidades agregadas de glucosa, reactivo y agua destilada para cada muestra.

Cuadro 1. Metodología para elaborar la curva patrón de glucosa

Concentración de Glucosa (g/L)							
Reactivos	Blanco	0,5	0,7	1,0	1,5	1,7	2,0
Glucosa (mL)	-	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agua (mL)	0,25	-	-	-	-	-	-
Reactivo DNS (mL)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agua destilada (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Determinación cuantitativa de la actividad enzimática de enzimas amilolíticas (α -amilasa y amiloglucosidasa) por el Método de Street-Close

El método fue empleado para evaluar las enzimas amilolíticas como α -amilasas y glucoamilasas.

Para la determinación de la actividad catalítica por el método de Street Close se prepararon dos tubos blanco y problema, ambos tubos contenían 0,1 ml de enzimas y agua destilada 0,4 ml para el tubo problema y 2,9 ml para el tubo blanco, pero solo el tubo problema contiene 2,3 ml de solución de

almidón, después de agregar la soluciones anteriores se lleva ambos tubos a incubación a 35°C por cinco minutos, al finalizar el proceso se retiraron los tubos del equipo (Baño de María) y se agregó 2,5 ml de ácido clorhídrico HCL al 0,1N y 0,1 ml de solución de yodo a ambos tubos. Se consideran positivos a la reacción aquellos tubos que presenten una coloración azul una vez agregado el Iodo, lo cual es indicativo de la inactividad de la enzima evaluada sobre el sustrato.

Para la curva de calibración se prepararon cinco tubos con 5,6 ml de contenido, pero con distintas concentraciones de soluciones como son agua destilada, ácido clorhídrico, solución yodada y de almidón, (ver Cuadro 2), se dejaron reposar por cinco minutos, al finalizar el tiempo se llevó al espectrofotómetro con la finalidad de medir la absorbancia a una longitud de onda de 550nm y obtener datos que seguidamente se emplearon para graficar la curva de calibración.

Preparación de los tubos para la curva de calibración de almidón.

- a) Preparar los tubos blancos, 1,2,3,4 y 5 del

Almidón(mg)		0,2 mg	0,4 mg	0,6 mg	0,8 mg	1 mg
Componentes	Blanco	M1	M2	M3	M4	M5
Solución de	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Almidón(ml)						
Agua destilada(ml)	3	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5
HCL 0,1 N(ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Solución Yodada(KI) (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

mismo modo que el tubo problema

- Agregar 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ml de solución de almidón (400 ppm) en cada uno de los tubos respectivamente menos en el tubo blanco
- Agregar 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 ml de agua destilada a cada uno de los tubos respectivamente.
- Agregar 2,5 ml de HCL 0.1 N a cada uno de los tubos respectivamente.
- Agregar solución iodada 0,1 ml a cada uno de los tubos.
- Dejar reposar por tiempo de 5 minutos y llevar a medir la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm en el espectrofotómetro.

Cuadro 2. Curva de calibración de almidón

Determinación de la actividad enzimática producción de glucosa en el tiempo para (α -amilasa y glucoamilasas)

- Se prepara 100 ml de una solución de almidón al 5%p/v
- Se adiciona 0,1 ml de enzima
- Se lleva a incubación a una temperatura de 60°C
- Se toma 1 ml de muestra en intervalos de tiempo cada 15 minutos
- Se adiciona 1 ml de solución de DNS
- Se lleva a ebullición por 10 minutos
- Se enfría y se adiciona 10 ml de agua destilada y se mide la absorbancia a 540 nm

Ensayo con papel de filtro para la determinación de la actividad Celulasa

Se utilizó el método descrito por Adney y Beker. En tubos de ensayo con 1mL de tampón citrato de sodio 0,1 mol/L (pH=4,8) y una tira de papel filtro Whatman 1; 1,0 x 6,0 cm (equivalente a 50 mg) como sustrato, se adicionaron 0,5 ml de la enzima. La mezcla se incubó en baño termostático de agua a 50 °C durante 60 minutos. Se añadieron 3 ml del reactivo DNS a cada tubo y se calentó a 100 °C durante 5 minutos para detenerla reacción. Se adicionó a cada tubo una cantidad de agua equivalente a 2,5 ml en 0,2 ml de mezcla de reacción y se determinó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

Determinación de la actividad enzimática de α-amilasa, glucoamilasa, celulasa, pululanasa y pectinasa a partir de los métodos de street close y dinitrosalicílico(DNS)

Ortiz López, Daniel José

Se determinó la relación de glucosa producida/ sustrato consumido empleando la siguiente ecuación:

$$\%y\left(\frac{p}{s}\right)=\frac{Glucosa\left(\frac{g}{l}\right).0,01}{g\ Celulosa}x100$$

Determinación cuantitativa de la actividad Pectinolítica

La Actividad enzimática fue evaluada por la liberación de azúcares reductores de la pectina (1% p/v pectina); la cual fue medida colorimétricamente, con el reactivo ácido 3,5 - Dinitrosalicílico (DNS). Se realizó una curva estándar de Glucosa (Miller et al. 1959). Se tomaron 100 ml de muestra a la cual se le adicionó 0,1 ml de enzima y se llevó a baño de María a una temperatura de 50°C, midiendo la absorbancia a 540 nm en intervalos de tiempos de 15, 30, 45,60 minutos y 3 horas para construir la curva de actividad enzimática en función del tiempo.

Determinación de la actividad enzimática de la Pululanasa

Se determinó la producción de azúcares reductores debido a la acción hidrolítica de la pululanasa sobre una solución de Maltodextrina al 1 %. Se tomaron 100 ml de muestra a la cual se le adiciono 0,1 ml de enzima y se llevó a baño de María a una temperatura de 50°C. Se tomaron muestras cada 15 minutos cuantificando los azúcares reductores liberados mediante el método del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959). Para ello, se adicionaron 1 ml del reactivo de DNS a cada una de las muestras anteriores y se llevó a ebullición durante 10 min a 100 °C. A continuación, las muestras se diluyeron con 10 mL de agua destilada, y se registró su absorbancia en 540 nm. Para la cuantificación de los azúcares reductores se realizó una curva de calibración

empleando glucosa como estándar. Una unidad de pululanasa corresponde a la cantidad de enzima que produce 1 μmol de azúcar reductor por min y ml, en las condiciones de reacción descritas.

Los valores de actividad enzimática fueron cuantificados como absorbancia del complejo Iodo-almidón a través del método de Street Close o método Amiloclásico. Este método muestra la degradación del almidón por el proceso de hidrólisis enzimática con las enzimas α-amilasas y glucoamilasa evaluadas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cuadro 3. Resultados obtenidos curva patrón de almidón a 550 nm

A	Concentración Almidón (mg/l)
0	0,002
0,016	0,2
0,024	0,4
0,042	0,6
0,045	0,8
0,056	1
α – Amilasa	0,098*
Glucoami lasa	0,222*

Cuadro 4. Resultados obtenidos curva patrón de Glucosa

Concentración(g/L)	Absorbancia
0,5	0,25
0,7	0,34
0,9	0,449
1,1	0,572
1,3	0,74
1,5	0,76
1,9	0,919

Todas las enzimas amilolíticas dieron negativas a la reacción con el yodo después de un tiempo de exposición de 5 minutos, lo cual demuestra la hidrólisis total del almidón (Cuadro 5).

Cuadro 5. Prueba enzimática de Street Close. Reacción con Yodo para diferentes enzimas amilolíticas durante la hidrólisis de una solución de almidón al 5% p/v.

Enzima	Reacción con Yodo
α-amilasa	Amarillo(-)
β-amilasa	Amarillo(-)
Glucoamilasa	Amarillo(-)
Termamyl 120 L	Amarillo(-)
Fungamyl	Amarillo(-)

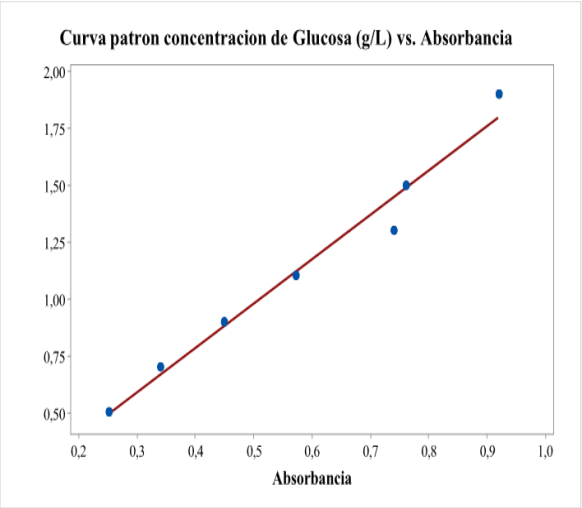


Figura 1. Curva patrón de glucosa empleando el método DNS

Ecuación:

Concentración de Glucosa (g/l) = 0,00424 + 1,953A

Cuadro 6. Resultados obtenidos de valores promedios de Absorbancia a 540 nm de la Actividad enzimática de las Enzimas Termamyl y Fungamyl.

Tiempo(min)	α-Amilasa	Glucoamilasa	Termamyl	Fungamyl
0	0,073	0,073	0,073	0,073
5	0,137	0,157	0,526	0,532
20	0,192	0,301	1,097	0,701
35	0,239	0,372	1,410	0,903
50	0,302	0,411	1,644	1,129
125	0,421	0,470	1,878	1,588
155	0,443	0,478	1,956	1,606

Cuadro 7. Resultados obtenidos de la concentración de glucosa a partir de la actividad enzimática de enzimas amilolíticas a 540 nm

Tiempo(min)	α -Amilasa	Glucoamilasa	Termamyl	Fungamyl
0	0,073	0,073	0,073	0,073
5	0,137	0,157	0,526	0,532
20	0,192	0,301	1,097	0,701
35	0,239	0,372	1,410	0,903
50	0,302	0,411	1,644	1,129
125	0,421	0,470	1,878	1,588
155	0,443	0,478	1,956	1,606

Se evidencia en la Figura 3, del grupo de enzimas amilolíticas evaluadas, las marcas Termamyl y Fungamyl producen mayor concentración de glucosa (1,96g/l) y (1,606 g/l) respectivamente a los 155 minutos de reacción durante la hidrolisis enzimática en una solución de almidón al 5 %p/v en comparación con el resto de las enzimas amilolíticas. De igual manera, las enzimas que presentaron menor producción de glucosa en esta prueba fueron glucoamilasa (0,478 g/l) y α -amilasa (0,443 g/l).

Cabe destacar que Fungamyl es una alfa-amilasa fúngica que ayuda a corregir una deficiencia común de harinas y asegura una calidad constante del pan mediante el uso de harina estandarizada. De igual manera,

Termamyl es una alfa amilasa de acción endotermoestable de alta calidad. Se utiliza para licuar el almidón de avena. Produce bebidas a base de avena con una viscosidad moderada.

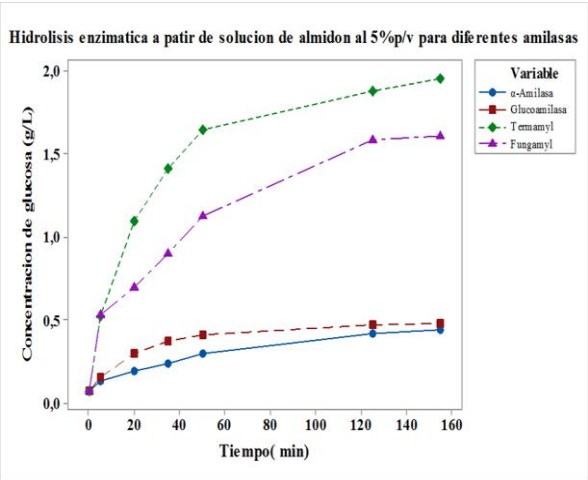


Figura 2. Hidrolisis enzimática empleando almidón al 5%p/v a partir de enzimas amilolíticas (α -amilasas y glucoamilasa).

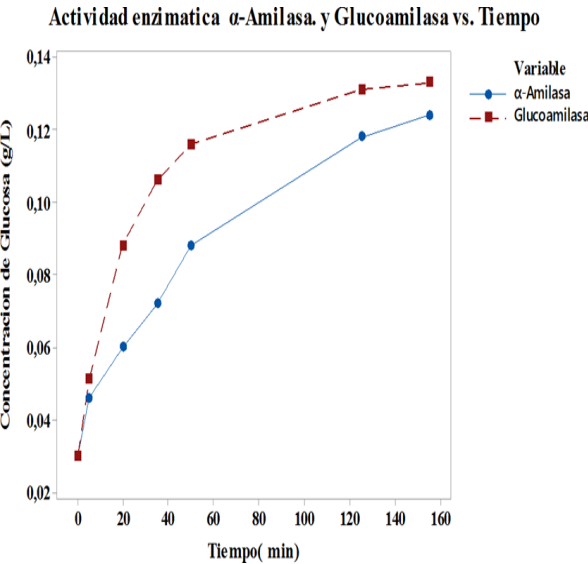


Figura 3. Actividad enzimática empleando almidón al 5%p/v a partir de enzimas amilolíticas (α -amilasas y glucoamilasa).

Cuadro 7. Resultados obtenidos de valores promedios de absorbancia a 540 nm. de la actividad enzimática de las enzimas Pululanasa y Pectinasa en sustrato maltodextrina (1% p/v) y pectina (1% p/v) respectivamente.

Tiempo(min)	Pululanasa	Pectinasa
15	0,643	0,456
30	0,689	0,570
45	0,698	0,580
60	0,936	0,818
150	0,761	0,610
180	0,610	0,719

Cuadro 8. Resultados obtenidos de la producción de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática de pectina al 1% p/v empleando Pectinasa.

Tiempo(min)	Concentración de Glucosa(g/L)
15	0,8948
30	1,1175
45	1,1370
60	1,6018
150	1,956
180	1,408

En relación a la enzima Pectinasa, su actividad enzimática según Figura 4, muestra la producción de glucosa a partir de la hidrólisis de una solución de pectina al 1% p/v. En esta, se puede apreciar una mayor producción de glucosa (1,956 g/l) a los 150 minutos de reacción.

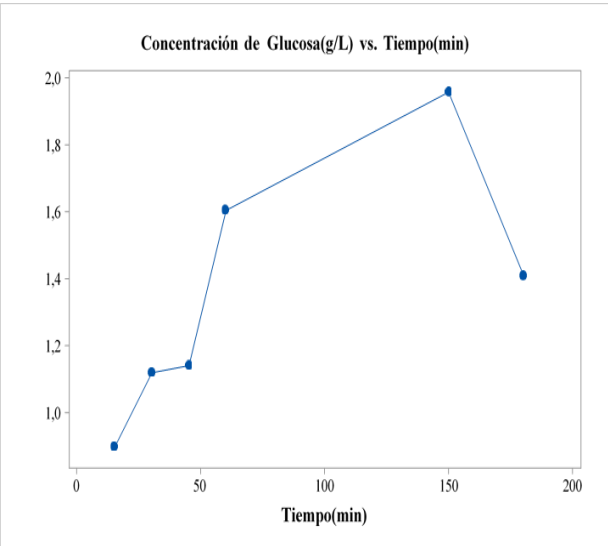


Figura 4. Producción de Glucosa a través del tiempo a partir de la hidrólisis enzimática de pectina al 1% p/v empleando Pectinasa.

La enzima Pululanasa evaluada en una solución de maltodextrina al 1%p/v como sustrato, alcanza una mayor producción de glucosa (1,8322 g/l) a los 60 minutos de reacción. (ver Figura 5).

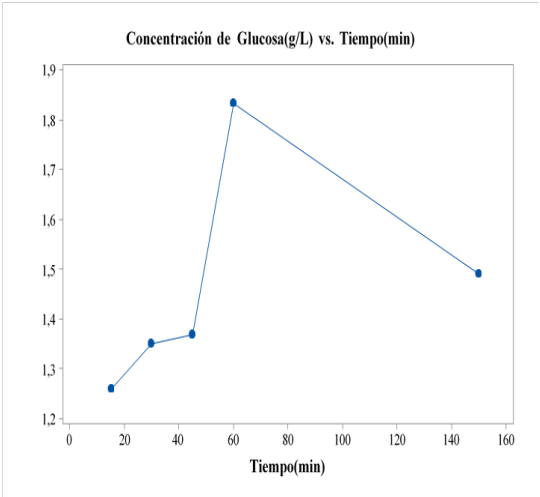


Figura 5. Producción de Glucosa a través del tiempo a partir de la hidrólisis enzimática de maltodextrina al 1% p/v empleando Pululanasa.

En relación a la enzima Celulasa, los resultados obtenidos según Cuadro 9, se obtuvo una producción de glucosa 0,3858 g/l y un % de glucosa producida/ sustrato consumido promedio igual a 6,17%.

Cuadro 9. Resultados obtenidos de la prueba enzimática de celulasa por el método de papel de filtro. Producción de Glucosa evaluada por espectrofotometría a 540 nm por el método DNS.

Muestra	Peso (g)	Absorbancia	Concentración de Glucosa(g/l)	%Relación Glucosa producida/sustrato consumido
1	0,0613	0,193	0,3812	6,22
2	0,0625	0,195	0,3851	6,10
3	0,0630	0,198	0,3909	6,20
$\bar{x}$	0,0623	0,195	0,3857	6,17

CONCLUSIONES

Todas las enzimas evaluadas al ser sometidas a las condiciones adecuadas de pH, sustrato, temperatura y tiempo, mostraron un comportamiento favorable en la producción de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática de sustratos como almidón, celulosa, pectina y maltodextrina.

El método de Street Close permitió evaluar de manera cualitativa y cuantitativa la actividad enzimática de las enzimas amilolíticas.

El método DNS, permitió evaluar la actividad

enzimática a partir de la producción de glucosa de todas las enzimas en estudios.

REFERENCIAS

- Bello, D.; Escobar, Y.; Sevillano, C. y Tarapues, M. (2018). Determinación cuantitativa de la actividad enzimática de un preparado enzimático puro. Universidad Politécnica Estatal de Carchi Industrias Agropecuarias y Ciencias Ambientales.
- Beltrán Gómez, Andrea Carolina; Fonseca Aldana, Oscar Yesid y Guerrero León, Yudy Rocío (2007). Evaluación de la aplicación de la enzima pectinasa obtenida a partir de *Aspergillus niger*, en el proceso de producción de pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* sororia) concentrada al vacío. Universidad de la Salle facultad de ingeniería de alimentos Bogotá D.C.2007.
- Carbonero P, (1975). Enzimas. Complemento de bioquímica industrias agrícolas. Universidad Politécnica Madrid. Escuela Técnica Superior de ingenieros agrónomos de Madrid.
- De la Cruz-Martorell, Kathy; Dustet-Mendoza, Julio César; Pérez-Caballero, Lisandra; Anaya-Villalpanda, Matilde (2016). Caracterización de enzimas celulasas de nuevas cepas fúngicas obtenidas a partir de bagazo de caña de azúcar, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Ciudad de La Habana, Cuba. Vol. 50, núm. 2, mayo-agosto, 2016, pp. 35-42.
- Hii, S. L., Tan, J. S., Ling, T. C., y Ariff, A. Bin. (2012). Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme Research*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/921362>
- Montañez, L. (2019). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. Fundación Universidad de América. *Revista de Investigación*, vol. 13 No. 1 enero-junio de 2020.
- Nieblas, C. (2016). Obtención de jarabes glucosados por hidrólisis enzimática empleando almidón de sorgo CIAPR-1321. Facultad de Química y Farmacia Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Cuba.
- Nisha, M., y Satyanarayana, T. (2016). Characteristics, protein engineering and applications of microbial thermostable pullulanases and pullulan hydrolases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(13), 661-5679. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7572-y>
- Reyna M., L.; Roble, R.; Reyes, M.; Menzoza, Y. y Romero, J. (2004). Hidrólisis enzimática del almidón. Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.* Vol. 7 N° 1, 2004. Págs. 40-44.
- Ramírez, J. y Ayala, M. (2014). Enzimas: ¿Qué son y cómo funcionan?. *Revista Digital Universitaria*. 15(12), 1-13 pp.

Determinación de la actividad enzimática de α -amilasa, glucoamilasa, celulasa, pululanasa y pectinasa a partir de los métodos de street close y dinitrosalicílico(DNS)

Ortiz López, Daniel José

Tomckowiack J., Camilo A.; Valenzuela, E.; Salas, M. y Martínez. O. (2014). Evaluación de las actividades enzimáticas celulasa, ureasa y la producción de ácido indol acético en cepas de bacterias y hongos aisladas desde suelo de un bosque templado del sur de Chile. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias.