

Departamento de Enzimología  
Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.)  
Madrid

## Glucosa oxidasa en análisis\*

por

Alberto Sols y Gertrudis de la Fuente

(Recibido para publicar el 14 de noviembre de 1957)

Todo enzima es un reactivo analítico en potencia. Y, dada la gran variedad de enzimas existentes, el campo posible de aplicación es virtualmente ilimitado.

En circunstancias favorables, los métodos basados en el empleo de un enzima — o de un sistema de enzimas — ofrecen ventajas decisivas sobre los basados en reacciones de química clásica. La razón principal es la especificidad de las acciones enzimáticas. PAULING (23) ha afirmado recientemente que, en su opinión, «la característica más sobresaliente de los enzimas es su especificidad». Pues bien, no cabe duda de que lo es en cuanto a reactivos analíticos potenciales.

Para que las circunstancias sean favorables hace falta que se den, además, dos condiciones: accesibilidad y facilidad de manejo. Y ninguna de éstas es muy propia de los enzimas, en principio. Pero las cosas van mejorando a este respecto. Cada día es mayor el número de enzimas fácilmente accesibles, a medida que se van identificando fuentes abundantes, se van desarrollando métodos simples de aislamiento y se van encontrando condiciones que permiten una buena conservación. Así que, aunque sin duda muchos enzimas serán siempre rarezas desde el punto de vista práctico, por su escasez e in-

\* Este trabajo ha sido subvencionado por un «grant» de los Lilly Research Laboratories y una beca a uno de los autores (A. S.) de la Fundación Juan March.

estabilidad, ya han dejado de ser excepción pequeña los incorporables a una utilización sistemática fuera de laboratorios especializados. En este sentido hay que resaltar el hecho de que en la última media docena de años la representación de preparados enzimáticos en el comercio ha dejado de estar limitada a unos cuantos enzimas hidrolíticos. Actualmente es ya un capítulo importante, cuyo rápido crecimiento permite prever una gran abundancia en un futuro muy próximo. En otra media docena de años, lo que ya es capítulo será familia numerosa.

En cuanto a la última condición, la de facilidad de manejo, hay diferencias marcadas de unos tipos de enzimas a otros. Desde este punto de vista, los enzimas que tienen mayor probabilidad de ser ampliamente útiles en análisis sistemático son los de requerimientos mínimos. Un enzima que no requiere coenzimas u otros cofactores se parece a un reactivo ordinario, y le supera por su especificidad. También a este respecto, a medida que crece el número de enzimas caracterizados aumentan también las posibilidades de selección de enzimas «sencillos» para casi cada objetivo deseable.

Un ejemplo ya clásico de enzima reactivo analítico es la ureasa como auxiliar en la determinación de urea. Entre los enzimas recientemente introducidos en el campo del análisis hay uno que presenta grandes ventajas en la determinación de un compuesto aún más interesante que la propia urea. Este compuesto es la glucosa, y el enzima la glucosa oxidasa. Ciertas glucosa oxidasas, como luego veremos. Inicialmente se preconizó la utilización de glucosa oxidasa sola (KELIN y HARTREE, 14), evaluando el resultado manométricamente. Una tal dependencia de un método físico ajeno al equipo habitual de laboratorios de análisis habría impedido que se generalizase el empleo de la glucosa oxidasa en análisis. Ahora, la feliz sugerencia de acoplar la glucosa oxidasa a un sistema peroxidasa-cromógeno oxidable (KESTON, 16), ha venido a poner al alcance de todo analista un sistema de métodos colorimétricos de detección y determinación cuantitativa de glucosa de un interés extraordinario, ya que a una gran especificidad se une una sensibilidad y sencillez realmente notables.

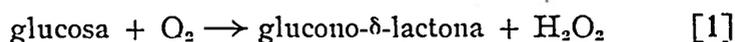
Desde que se apuntó esta nueva vía analítica nos pareció importante el ampliar ciertos aspectos del conocimiento de la glucosa oxidasa, particularmente en cuanto a los límites de su especificidad de sustrato (25). Ahora, mientras empieza a generalizarse la distribución de preparados comerciales para uso de analistas, consideramos que puede ser útil una exposición de conjunto de nuestras observaciones sobre este tema,

junto con una discusión de los aspectos pertinentes de especificidad y cinética de la glucosa oxidasa.

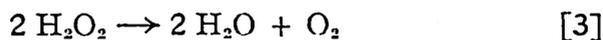
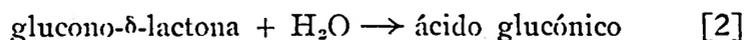
#### Propiedades de la glucosa oxidasa

Se conocen varios enzimas capaces de oxidar la glucosa. Todos ellos han sido descritos con el nombre común de glucosa oxidasa. Sin embargo, sus características indican la existencia de al menos tres tipos netamente distinguibles por sus especificidades de sustrato y aceptor de hidrógeno. De estos tres tipos hay uno que es particularmente específico para la glucosa y que utiliza el oxígeno molecular como aceptor de hidrógeno. Este enzima ha sido bien caracterizado a partir de *Penicillium notatum* por KEILIN y HARTREE (13, 15). En la literatura ha aparecido con diversos nombres, principalmente los de notatina, glucosa oxidasa y glucosa aerodehidrogenasa (BENTLEY, 4). Creemos preferible seguir utilizando el nombre a la vez clásico y expresivo de glucosa oxidasa, teniendo en cuenta que en el uso vigente este nombre — sin cualificaciones — corresponde a la glucosa oxidasa del *Penicillium notatum* y por extensión a los de especificidad análoga, aunque la procedencia sea distinta. Este parece ser el caso de la glucosa oxidasa anteriormente encontrada en el *Aspergillus niger* (MÜLLER, 21, y FRANKE, 7). Los otros tipos caracterizados están representados por los enzimas del *Aspergillus oryzae* (22) y del hígado (28).

La reacción catalizada por la glucosa oxidasa es :



Ambos productos son poco estables y tienden a descomponerse en la siguiente forma :



La reacción [3] puede ser acelerada por el enzima catalasa, que suele acompañar a los preparados de glucosa oxidasa. Para la valoración manométrica de glucosa con glucosa oxidasa es conveniente la presencia de un exceso de catalasa para asegurar proporcionalidad entre consumo de oxígeno y glucosa (14).

La glucosa oxidasa es un enzima bastante estable, con actividad máxima a pH alrededor de 5,6. No se conocen activadores, ni se ha apreciado sensibilidad particular a pre-

suntos inhibidores. Preparados de este enzima pueden obtenerse fácilmente de fuentes comerciales\*.

### ESPECIFICIDAD DE SUBSTRATO

Desde el clásico estudio de KEILIN y HARTREE (13, 15), la glucosa oxidasa ha venido siendo considerada como un enzima altamente específico (ver 4). Después de examinar más de medio centenar de compuestos estructuralmente relacionados, KEILIN y HARTREE llegaron a la conclusión de que la glucosa oxidasa tiene como substrato la glucosa en la

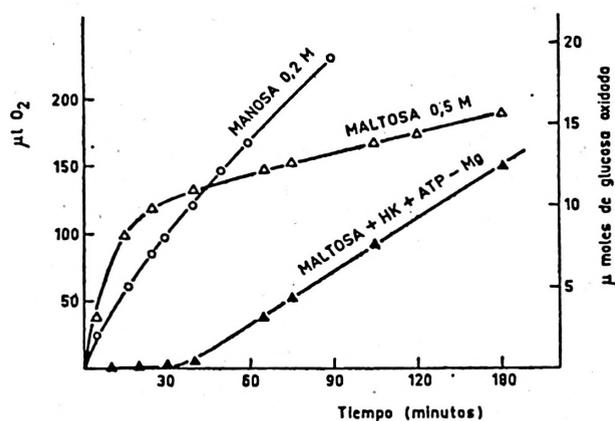


Figura 1

#### Maltosa y glucosa oxidasa

Experimento manométrico en que se mide la fijación de oxígeno a 30° y en atmósfera de aire.

Cada vaso llevó en el compartimiento principal todos los componentes del sistema excepto la glucosa oxidasa que se colocó en el compartimiento lateral, para ser incorporada a tiempo cero.

Se emplearon 20 mg. de glucosa oxidasa Sigma por vaso, un exceso de hexokinasa (HK) y 20 micromoles de adenosintrifosfato (ATP)-Mg.

La porción inicial de la línea  $\Delta$  corresponde a una impureza de glucosa presente en la maltosa (Pfanstiehl, C. P.) y el comienzo de actividad en la línea  $\blacktriangle$  corresponde al momento en que se ha agotado el ATP. La falta de actividad inicial indica que la glucosa oxidasa no actúa sobre la maltosa sino sobre la glucosa liberada por acción maltásica del enzima; su mayor pendiente ulterior, respecto al vaso que no lleva hexokinasa, se debe a que también el preparado de hexokinasa utilizado (27) tiene algo de acción maltásica contaminante.

Como referencia de velocidad, se incluye un vaso con manosa.

\* Sigma Chemical Corporation, St. Louis, Mo.; Takamine Laboratories, Clifton, N. J.; Mann Research Laboratories, Nueva York, N. Y.; Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio; K & K Laboratories, Long Island City, N. Y.; C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim, Alemania.

forma  $\beta$ ; de los demás compuestos estudiados — incluyendo todas las D-aldohexosas — sólo observaron una actividad del orden del 1 por 100 con manosa y menos aún con altrosa, galactosa y la propia  $\alpha$ -glucosa, aparte de una ligera actividad sobre cuatro derivados de la glucosa, entre ellos la maltosa. Una actividad ligera sobre 6-deoxi-6-fluoroglucosa fué posteriormente observada por BLAKLEY y BOYER (5).

Nosotros hemos encontrado que la 2-deoxiglucosa es fácilmente oxidada por la glucosa oxidasa (25), lo que también ha sido observado independientemente por McCOMB y colaboradores (18). Otro sustrato relativamente bueno es la glucosona, según observación de BAYNE (2) y caracterización cuantitativa nuestra \*. En cambio, hemos descartado a la maltosa como presunto sustrato de la glucosa oxidasa, por el experimento descrito en la figura 1.

TABLA I  
Especificidad de la glucosa oxidasa

Compuesto	Velocidad máxima relativa	Coefficiente de oxidación *
Glucosa . . . . .	100	1,00
2-Deoxiglucosa . . . . .	25	0,07
Glucosona . . . . .	30	0,03
6-Deoxi-6-fluoroglucosa . . . . .	> 3	0,004
4 : 6-Bencilidenglucosa . . . . .		0,004**
6-Metilglucosa . . . . .		0,004**
Manosa . . . . .	> 2	0,003
Glucosamina (a pH 8) . . . . .	> 2	0,003
4,6-Dimetilglucosa . . . . .		0,002**
Xilosa . . . . .	> 0,4	0,0006

\* Los coeficientes de oxidación indican las velocidades relativas a concentración suficientemente baja ( $< 0,001$  M) para cinética de primer orden incluso con el sustrato de mayor afinidad.

\*\* Calculados a partir de los datos de KEILIN y HARTREE (13, 15), suponiendo que la  $K_m$  de estos compuestos es bastante mayor de 0,05 M.

Todos los demás compuestos con los que se ha detectado alguna actividad tienen un coeficiente de oxidación menor de 0,0005. Además de los observados por KEILIN y HARTREE nosotros hemos encontrado las siguientes: 2-C-hidroximetilglucosa, 0,0002 y N-acetilglucosamina, 0,00001.

No se ha encontrado ningún inhibidor competitivo de la glucosa oxidasa, con la posible excepción de la glucono- $\delta$ -lactona (15, 25).

Para detalles complementarios ver (25).

\* Estas observaciones indican que el hidróxilo en el carbono 2 de la glucosa no es muy importante para la glucosa oxidasa. Así, pues, la mayor dificultad para actuar sobre manosa debe interpretarse como resultado de la inversión en C2.

En la tabla I resumimos el estado actual de la especificidad de sustrato de la glucosa oxidasa, según nuestros resultados y los de KEILIN y HARTREE. Nuestras observaciones confirman en este caso lo que en términos generales afirma uno de nosotros en otro lugar (26): «puede decirse que los enzimas considerados como "absolutamente" específicos son simplemente enzimas insuficientemente estudiados». A este respecto el criterio de selección y la inclusión del factor afinidad son más importantes que el número de compuestos observados.

Con respecto a la dificultad de oxidación de la  $\alpha$ -glucosa por la glucosa oxidasa es interesante mencionar que la existencia de una mutarrotasa, identificada por KEILIN y HARTREE como contaminante en preparaciones poco purificadas, impide de ordinario que en la oxidación total de la glucosa llegue a ser limitante la mutarrotación.

#### Valoración colorimétrica de la glucosa oxidasa

Como indicamos en la introducción, KESTON (16) sugirió a comienzos de 1956 un método que hacía posible la determinación colorimétrica de la glucosa con glucosa oxidasa, mediante el acoplamiento de peroxidasa como enzima auxiliar y un cromógeno oxidable por la misma con el  $H_2O_2$  producido en la oxidación de la glucosa. Conservando la ventaja de la especificidad del método enzimático, este procedimiento viene a facilitar considerablemente la utilización analítica de la glucosa oxidasa\*. Además, la sensibilidad aumenta al substituir el método manométrico por este colorimétrico.

El interés práctico de este método analítico movilizó inmediatamente a varias firmas de productos para laboratorio. La aplicación práctica concreta tomó desde el principio dos formas: la ordinaria, cuantitativa, con reactivos en solución; y una adaptación a papel indicador para la detección rápida de glucosa en orina.

#### MÉTODO FOTOMÉTRICO

La proporcionalidad entre glucosa y color depende de la presencia de un exceso de actividad peroxidásica, sobre la

---

\* La especificidad de la glucosa oxidasa puede utilizarse también como control de la determinación por un método de reducción aplicado sin y con tratamiento de la muestra problema con exceso de glucosa oxidasa. La diferencia corresponde a glucosa genuina, salvo las posibles limitaciones dependientes de que la especificidad del enzima, aunque notable, no es absoluta, como hemos visto. Este proceder ha sido utilizado recientemente por Froesch y Renold (9).

glucosa oxidasa, y de cromógeno sobre glucosa. Por su sensibilidad, los márgenes utilizables en cuanto a glucosa valorable son tales que la concentración inicial de glucosa está tan por debajo de la que sería necesaria para saturar al enzima que la velocidad *inicial* es estrictamente proporcional a la glucosa presente, como llega a serlo eventualmente la cantidad de color alcanzado por oxidación de toda la glucosa presente (fig. 2).

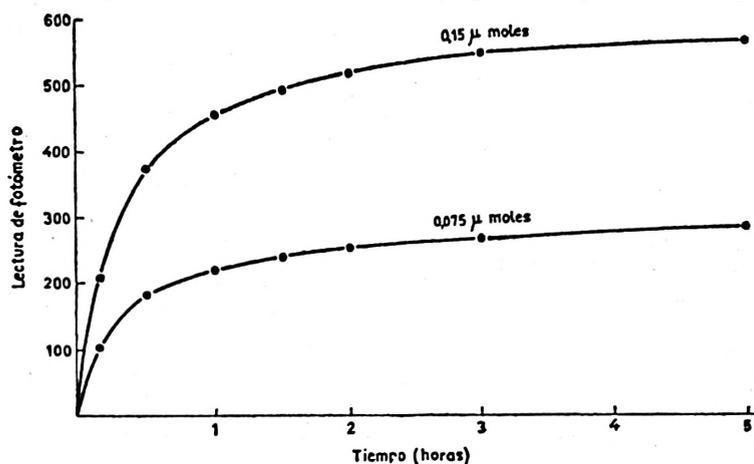


Figura 2

#### Glucosa y Glucostat: cinética de la reacción

En microtubos del fotómetro Klett-Summerson se colocó glucosa en las cantidades indicadas en la gráfica con agua hasta 0,2 c. c. y 2 c. c. de Glucostat, dejando los tubos a temperatura ambiente (20°). Lecturas con el filtro 42 a los tiempos indicados en abscisas.

La casa Worthington (Freehold, New Jersey) ha sido la primera en introducir en el comercio, con el nombre de «Glucostat», un reactivo en tubos, con los enzimas liofilizados en proporciones adecuadas, listo para uso sin más requisito que disolverlos. Cada porción de enzimas, para preparar 100 c. c. de reactivo, está distribuido en dos tubos: uno tiene los enzimas y se disuelve en agua, el otro tiene colorante (*o*-dianisidina) y se disuelve en metanol; reuniendo el contenido de ambos se tiene el reactivo en disposición de usarse. 0,1 c. c. de plasma o suero, con 10 c. c. de reactivo, da suficiente color en 10 minutos para leer en fotocolorímetro con filtro azul (la longitud de onda óptima es ca. 450 m-micras), pero si se dispone de cubetas pequeñas o microtubos, se puede reducir proporcionalmente todo y ahorrar reactivo. Con los enzimas va fosfato para dar un *pH* de 7 (concentración final: 0,005 M).

Al utilizar el reactivo en la forma preconizada por sus fabricantes, observamos los siguientes inconvenientes :

En primer lugar, el contenido de los tubos se enturbia y llega a formar un precipitado cuando la cantidad de color formado es alta; este enturbiamiento puede causar errores considerables en la medida de densidades ópticas. Esta dificultad ha quedado resuelta satisfactoriamente mediante el empleo de un detergente no iónico; nos ha dado excelentes resultados el «Triton X-100» (Rohm & Haas, Philadelphia, Pensilvania) al 0,2 por 100, por lo que sistemáticamente lo introducimos al preparar la solución de Glucostat, pudiéndose así llegar a colores intensos y largos tiempos de reacción (24 horas o más) sin que aparezca turbidez ni en nada se altere el desarrollo del color.

En segundo lugar, el tiempo que media entre la adición del reactivo y la lectura del color es crítico; diferencias de segundos dan errores considerables en las lecturas e incluso mientras se está haciendo la lectura está variando el color. La adición de I gota de HCl 4 N que recomiendan los fabricantes no resulta satisfactoria, porque no detiene del todo la reacción. Nosotros hemos substituído el HCl por KOH concentrada: II o III gotas de KOH al 40 por 100, añadidas a tiempo exactamente medido y mezcladas rápidamente, detienen la reacción y dejan el color inalterado durante horas, en disposición de hacer las lecturas cómodamente cuando convenga.

Cuando se dispone de varios tubos, resulta práctico añadirles el reactivo con intervalos de un minuto, dejar pasar 10 minutos (o más si conviene porque la reacción sea lenta y se desee alcanzar mayor intensidad de color) y cortar la reacción añadiendo la potasa en el mismo orden y con los mismos intervalos de un minuto; un patrón con 0,1 c. c. de glucosa al 0,1 por 100 por 10 c. c. de reactivo (o la reducción proporcional correspondiente para 5 c. c. o el volumen que se desee usar) y un blanco, completan la serie.

Si no hay interés en hacer pronto la lectura fotométrica, es preferible dejar en marcha la reacción hasta compleción. El desarrollo de color alcanza una meseta virtualmente estable pasadas unas tres horas a temperatura ambiente, o dos horas a 30° ó una hora a 37°. Por este procedimiento, además de evitarse la necesidad de control cuidadoso del tiempo y la adición de KOH, se obtiene unas tres veces más sensibilidad, ya que en diez minutos a temperatura ambiente se oxida aproximadamente 1/3 de la glucosa presente. HUGGET y NIXON (11) recomiendan una hora a 35°. En los casos de querer valorar glucosa en presencia de otros azúcares que puedan ser subs-

tratos marginales, conviene cortar la reacción a los diez minutos para beneficiarse al máximo de la diferencia de coeficiente de oxidación. Por el contrario, en presencia de sustancias que puedan afectar la cinética enzimática puede ser esencial el esperar hasta oxidación completa. Cuando se piensa esperar a que la reacción sea completa, debe emplearse menos proporción de problema del preconizado para diez minutos de reacción. Para plasma sanguíneo recomendamos el uso de 0,05 c. c. para 10 c. c. de reactivo, lo que permite valorar glucemias hasta de 300 a 400 mg por 100. Con los microtubos del Klett pueden determinarse glucemias con 0,01 c. c. de plasma y 2 c. c. de Glucostat.

El decrecimiento progresivo de velocidad inherente a la cinética de primer orden hace que en las condiciones del método fotométrico no parezca llegar a ser limitante la mutarrotación \*

El Glucostat en solución es poco estable. Lentamente se colorea dando lugar a blancos altos. Esto se debe probablemente a oxidación aerobia del cromógeno por la peroxidasa (ver 17); lo que sería demasiado incómodo de evitar. Incluso la congelación que asegura la buena conservación de los enzimas, no impide del todo esta deterioración del reactivo. Así pues, el ideal es usar reactivo disuelto en el día.

En cuanto al pH del Glucostat, hemos observado que apenas hay variación en su comportamiento si se le baja hasta 5,5. Esto permite independencia de pequeños cambios de pH que puedan ocasionarse por sustancias que acompañen al problema. Solamente en casos extremos puede ser recomendable el reforzar la capacidad tampón del reactivo. La concentración de fosfato puede elevarse diez veces sin afectar al sistema enzimático.

#### PAPEL INDICADOR

Dentro del año 1956, apareció en el mercado, lanzado por las casas Eli Lilly & Co. (Indianápolis, Indiana) y Ames & Co. (Elkhart, Indiana), otra modalidad de reactivo colorimétrico, impregnando tiras de papel, y que se usa de modo análogo a los indicadores de pH.

Según una descripción publicada por el departamento de investigación de la Eli Lilly (6), se trata de un papel impregnado con los enzimas glucosa oxidasa, catalasa y peroxidasa más *o*-tolidina y un colorante amarillo de fondo que

---

\* Keston recomendó el uso de tampón pirofosfato (16), que acelera la mutarrotación. (Comunicación personal.)

enmascara el color propio de la orina, a la cual está especialmente destinado; el colorante *o*-tolidina se encuentra en la forma leuco y pasa a color azul intenso por la acción oxidante del sistema agua oxigenada-peroxidasa. El conjunto adopta colores que van desde el amarillo al azul pasando por los diferentes tonos de verde a medida que se va produciendo el agua oxigenada. Según los autores (6), la catalasa actúa como regulador de la velocidad de oxidación del colorante. El envase lleva una escala de colores, de modo que, comparando con ella el tono alcanzado al cabo de un minuto de haber mojado el papel en la orina, se tiene una indicación semicuantitativa de la concentración de glucosa.

En el Congreso Internacional de Química Clínica, celebrado en Nueva York en septiembre de 1956, hubo tres comunicaciones sobre esta cuestión; en ellas se describen propiedades y aplicaciones de los productos «Tes-tape» de la Eli Lilly («Glucocinta», para los países de habla española) y «Clinistix» de la Ames, este último sólo para observación cualitativa.

En una discusión objetiva de estos papeles indicadores, realizada por HUNT, GRAY y THOROGOOD en Inglaterra (12), se plantea la dificultad de obtener resultados cuantitativos y la del posible exceso de sensibilidad del reactivo, ya que resultados positivos débiles pueden no tener importancia y, en cambio, el que desde alrededor del 2 por 100 en adelante ya no se pueda distinguir entre este valor y otro diez veces mayor, es un serio inconveniente.

Según nuestra experiencia, el Glucocinta puede dar resultados semicuantitativos satisfactorios. Una discriminación dentro de las glucosurias muy elevadas puede conseguirse por el simple recurso de diluir un volumen de orina problema con cinco volúmenes de una orina negativa. Con disoluciones de composición más simple que la orina puede mejorarse la capacidad de evaluación cuantitativa procediendo del siguiente modo:

En una placa de porcelana con pocillos, de las que se emplean para análisis a la gota o para acuarela, se disponen disoluciones de glucosa de concentración conocida y no superior a 0,005 M. Si el problema da color notablemente superior al patrón más concentrado, se diluye convenientemente. En tales condiciones la velocidad de aparición de color es proporcional a la concentración de glucosa o, dicho de otro modo, los tiempos necesarios para que dos muestras alcancen la misma intensidad de color son inversamente proporcionales a las concentraciones, siempre que no se opere en zonas extremas. Por ejemplo, una tira se moja en disolución de concentración X

y un minuto después se moja otra en la disolución 0,001 M de glucosa; si al cabo de dos minutos de iniciarse el experimento se han igualado los colores, el problema tendrá una concentración aproximadamente 0,0005 M.

Una aplicación particular de estos papeles indicadores que puede ofrecer interés, está en relación con la cromatografía de azúcares, donde conviene frecuentemente conocer la posición de la glucosa como punto de referencia; humedeciendo una tira de Glucocinta y adhiriéndola al cromatograma mediante dos láminas de vidrio, a lo largo de la línea de desarrollo, apareció una mancha azul en el punto en que se encuentra la glucosa (basta 5  $\mu$  de glucosa para que la mancha sea muy claramente visible); después de secar el cromatograma queda útil para revelarlo con reactivos adecuados para otros azúcares, por ejemplo cetosas, ésteres fosfóricos, otras aldosas, etc.

#### LA GLUCOSA OXIDASA COMO ENZIMA AUXILIAR EN LA VALORACIÓN DE OTROS ENZIMAS

La especificidad de la glucosa oxidasa y las características de los métodos de determinar glucosa con la misma permiten

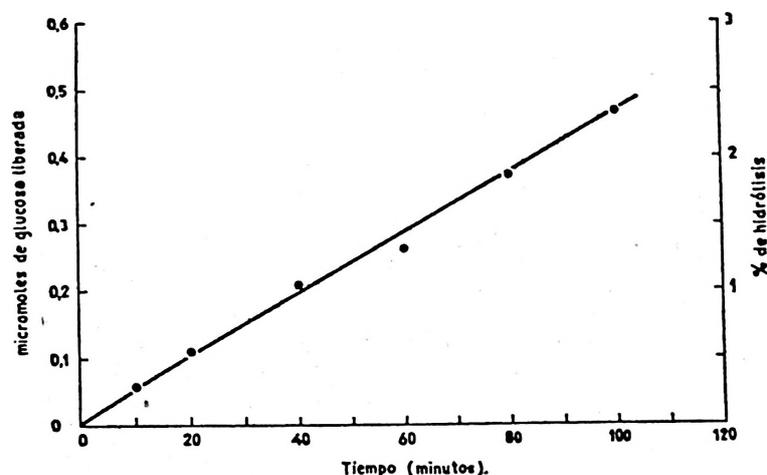


Figura 3

#### $\alpha$ -Glucosidasa y Glucostat

Valoración de una  $\alpha$ -glucosidasa de levadura con Glucostat. En una serie de tubos se colocaron 0,02 c. c. de maltosa 0,5 M, 0,02 c. c. de tampón fosfatos 0,4 M pH 7 y 0,02 c. c. de un homogenado de levadura convenientemente diluido; después de tiempos de incubación marcados en abscisas, a 30°, se añadieron 2,0 c. c. de Glucostat y 10 minutos después KOH en la forma descrita en el texto. Se ha hecho corrección por blanco (tubo correspondiente a tiempo nulo de incubación).

utilizarla provechosamente en la valoración de enzimas que produzcan o consuman glucosa. Ya con el método manométrico KEILIN y HARTREE (14) presentaron ejemplos interesantes en relación con glicosidasas y ciertas fosfatasas. Nosotros hemos adaptado el Glucostat a la valoración y a la investigación de

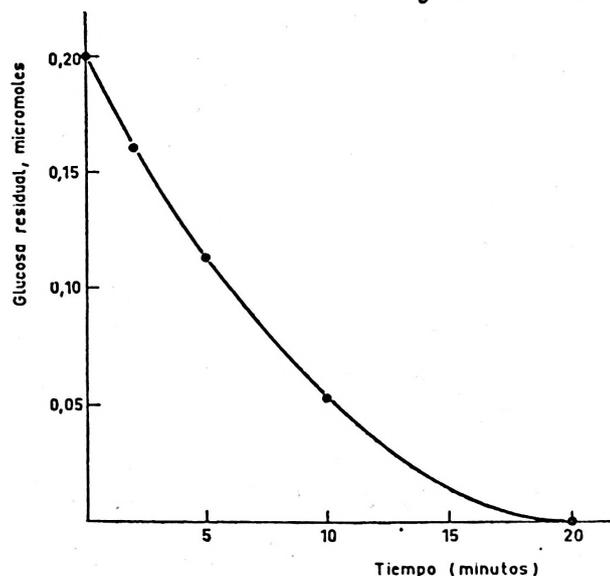


Figura 1

#### *Hexokinasa y Glucostat*

A tubos pequeños conteniendo 0,2 micromoles de glucosa, 0,75 micromoles de ATP-Mg y 2 micromoles de  $PO_4$ , pH 7,5, en 0,1 c. c. y colocados en baño a 30°, se añadió 0,1 c. c. de un preparado de hexokinasa de levadura. A distintos intervalos de tiempo se añadió 2 c. c. de Glucostat conteniendo 0,05 M  $PO_4$  y 0,01 M etilendiamino tetraacetato. Pasadas aproximadamente dos horas se midió el color desarrollado en cada tubo. Los tiempos de la figura son los de actividad de la hexokinasa, la cual termina al diluir con el Glucostat modificado.

ciertas características de  $\alpha$ -glucosidasa (10) y hexokinasa (27). Las figuras 3 y 4 ilustran la sensibilidad y sencillez de este doble tipo de aplicación. Queremos resaltar que el poder disponer de un método tan sencillo y eficiente de explorar glicosidasas en levaduras abre perspectivas muy interesantes para una clasificación racional de las mismas. En este sentido indicaremos que sería muy interesante el desarrollo de métodos similares en sencillez y seguridad para algunos otros enzimas fundamentales. En nuestro laboratorio se ha conseguido sistematizar un micrométodo de esta naturaleza para la exploración de kinasas en levaduras (24).

### Material y métodos

Dada la índole de este artículo, la procedencia de los principales materiales utilizados ha sido consignada a lo largo del texto. Además de los indicados, se han utilizado los siguientes: glucosona y 2-C-hidroximetilglucosa, amablemente puestos a nuestra disposición por los doctores S. Bayne y A. C. Neish, respectivamente; los demás productos utilizados son de las procedencias indicadas en trabajos anteriores de este laboratorio.

Hemos observado que la incorporación al Glucostat de 0.01 M etilendiaminotetraacético neutralizado mejora considerablemente la estabilidad del reactivo retardando la oxidación inespecífica del cromógeno. Esta adición permite conservar el reactivo durante varios días en la nevera.

Tenemos noticia de que se están preparando en España reactivos para detección y valoración enzimática de glucosa: «Glucontrol» y «Glucontrol analítico», respectivamente, Laboratorio LETI-UQUIFA.

### Resumen

Los enzimas pueden ser muy útiles como reactivos analíticos por su especificidad. La glucosa oxidasa es particularmente interesante por su alta especificidad, ya que prácticamente no actúa sobre ningún otro azúcar o derivado excepto la 2-deoxiglucosa y la glucosona. Los métodos colorimétricos basados en el acoplamiento con peroxidasa ofrecen a la especificidad una sensibilidad y sencillez notables, tanto en la forma cuantitativa fotométrica como en la semicuantitativa de papel indicador. Se discuten las condiciones de utilización de esos métodos para la determinación de glucosa y su adaptación al ensayo de enzimas que producen o consumen glucosa.

### Summary

#### Glucose oxidase as analytical reagent

Enzymes are potential analytical reagents which can be very important because of their specificity. Other conditions for a practical value are availability and simplicity of requirements for activity. In both respects there is presently a rapid increase of possibilities. Glucose oxidase fulfills these requirements in a very satisfactory degree. The recent development of colorimetric methods based on its action has opened a very useful way in the field of detection and determination of glucose.

Among the enzymes known as glucose oxidases those obtained from *Penicillium notatum* and *Aspergillus niger* are easily available from commercial sources, fairly stable, do not require

cofactors, and have a fairly high specificity for glucose. Among nearly one hundred sugars and sugar derivatives which have been examined only the following have oxidation coefficients greater than 0.0005 with reference to glucose as unity: 2-deoxyglucose, 0.07; glucosone, 0.03; 6-deoxy-6-fluoroglucose, 4:6-benzylideneglucose, and 6-methylglucose 0.004; mannose and glucosamine (the latter at pH 8) 0.003; 4,5-dimethylglucose, 0.002; and xylose, 0.0006. No competitive inhibitors have been found, with the possible exception of glucono- $\delta$ -lactone.

The coupling of glucose oxidase with an excess of peroxidase and a chromogenic peroxidase substrate has greatly increased the practical value of glucose oxidase as an analytical and experimental tool. The commercial reagent «Glucostat» (Worthington) can be improved by the incorporation of 0.2 % Triton X-100 (Rohm & Haas) to prevent turbidity, and 0.01 M etilendiaminetetraacetate, pH 7.0, to increase the stability of the reagent on storage and lower the blanks. Conditions of use of the photometric method are discussed, with particular emphasis on the peculiarities derived from the first order kinetics, which in turn is a necessary consequence of the sensitivity of the method and the rather low affinity of glucose oxidase for its substrate. It appears advisable to allow the oxidation of glucose to go to completion rather than to measure the colour developed in a fixed short period of time, except in some special cases. In the latter case, the reaction can be better stopped by the addition of about 1/20th volume of 40 % KOH.

The adaptation of the colorimetric method to indicator paper («Tes-tape», Eli Lilly) is very useful for the detection of glucose in urine and other fluids. The difficulties involved in the quantitation of this test are discussed. For dilute glucose containing solutions better quantitation can be achieved by comparing times required for equal color with different samples rather than observing the intensity of color at a fixed time. The indicator paper offers a very simple way of identifying glucose spots in chromatograms.

With glucose oxidase it is easy to develop very simple and sensitive methods to assay enzymes producing or consuming glucose. As an illustration, experiments with  $\alpha$ -glucosidase and hexokinase are presented.

### Bibliografía

- (1) ADAMS, I. C., Jr., BURKHART, C. E., y FREE, A. E.: *Science*, **125**, 1082, 1957.

- (2) BAYNE, S., comunicación personal.
- (3) BENTLEY, R., y NEUBERGER, A. : *Biochem. J.*, **45**, 584, 1949.
- (4) BENTLEY, R. : *Glucose Aerodhydrogenase (glucose oxidase)*, en *Methods in Enzymology*, ed. por S. P. Colowick y N. O. Kaplan, Academic Press, Nueva York, vol. I, 340, 1955.
- (5) BLAKLEY, E. R., y BOYER, P. D. : *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 576, 1955.
- (6) COMER, J. P. : *Anal Chem.*, **28**, 1748, 1956.
- (7) FRANKE, W. : *Ann.*, **555**, 111, 1944.
- (8) FREE, A. E., ADAMS, E. C., y KERCHER, M. L. : *Clinical Chemistry*, **2**, 236, 1956.
- (9) FROESCH, E. R., y RENOLD, A. E. : *Diabetes*, **5**, 1, 1956.
- (10) FUENTE, G. DE LA, y SOLS, A., pendiente de publicación.
- (11) HUGGETT, A. ST. G., y NIXON, D. A. : *Biochem. J.*, **66**, 121, 1957.
- (12) HUNT, J. A., GRAY, C. H., y THOROGOOD, D. E. : *British Med. J.*, n.º 4992, 586, 1956.
- (13) KEILIN, D., y HARTREE, E. F. : *Biochem. J.*, **42**, 221, 1948.
- (14) KEILIN, D., y HARTREE, E. F. : *Biochem. J.*, **42**, 230, 1948.
- (15) KEILIN, D., y HARTREE, E. F. : *Biochem. J.*, **50**, 331, 1952.
- (16) KESTON, A. S. : *Abstracts American Chemical Society*, 129 th Meeting, 31C, 1956.
- (17) MASON, H. S., ONOPRYENKO, I., y BUHLER, D. : *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 225, 1957.
- (18) MCCOMB, R. B., YUSHOK, W. D. y BATT, W. G. : *J. Franklin Inst.*, **236**, 161, 1957.
- (19) MORAN, J. J., LEWIS, P. L., REINHOLD, J. G. y LUCKENS, F. D. W. : *Clinical Chemistry*, **2**, 235, 1956.
- (20) MORELAND, F. B. : *Clinical Chemistry*, **2**, 236, 1956.
- (21) MÜLLER, D. : *Enzymologia*, **10**, 40, 1941.
- (22) OGURA, Y. : *J. Biochem.*, **39**, 311, 1952.
- (23) PAULING, L. : en *Enzymes Units of Biological Structure and Function*, Symposium Internacional del Hospital Henry Ford, Academic Press, 1956, pág. 177.
- (24) SOLS, A., LOSADA, M., y ROSELL, M., pendiente de publicación.
- (25) SOLS, A., y FUENTE, G. DE LA : *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 206, 1957.
- (26) SOLS, A., *Fosforilación enzimática y transporte activo de azúcares*, pendiente de publicación.
- (27) SOLS, A., FUENTE, G. DE LA, y VILLAR-PAJAS, C., pendiente de publicación.
- (28) STRECKER, H. J., *Glucose dehydrogenase from liver*, en *Methods in Enzymology*, ed. por S. P. Colowick y N. O. Kaplan, Academic Press, New York, Vol. I, 335, 1955.

