



Universidad Nacional Autónoma  
de México

FACULTAD DE QUIMICA

Producción, Purificación y Caracterización de  
Alfa-Amilasa de Aspergillus oryzae Comparada  
con Alfa-Amilasa Comercial de Bacillus subtilis

447

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
INGENIERO QUIMICO

P R E S E N T A

MARTIN MANUEL TREJO BURGUEÑO

México, D. F.

1976



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

CLAS. Desil

AGE 1976

FECHA 1976

PROG. \_\_\_\_\_

~~420~~ 420



BUIN

J U R A D O

PRESIDENTE: \_\_\_\_\_  
PROFRA. NINFA GUERRERO DE CALLEJAS

VOCAL: \_\_\_\_\_  
ING. ENRIQUE GARCIA GALEANO

SECRETARIO: \_\_\_\_\_  
I.Q. EMILIO BARRAGAN HERNANDEZ

1er. SUPLENTE: \_\_\_\_\_  
DRA. ANGELA SOTELO LOPEZ

2do. SUPLENTE: \_\_\_\_\_  
ING. RUBEN BERRA GARCIA Y COSS.

Sitio donde se desarrolló el tema: Facultad de Química.  
UNAM.

Asesor del Tema: Ing. Enrique García Galeano

Sustentante: Martín Manuel Trejo Burgueño.



A mis padres:

Sr. Ernesto Trejo Durán

Sra. Rosario Burgueño de Trejo, por su real apoyo.

A mi esposa:

Profesora y Licenciada María Dolores Castro  
de Trejo, siempre una compañera cariñosa e  
inteligente.

A mis hermanos:

José Ernesto

María Angelina

Marcos Ernesto

Oscar Sabino

María del Rosario

María Concepción

María Manuelita

Con todo mi cariño.

A:

María Angelina Trejo Cebreros (q.e.p.d.), su solida  
ridad e ilimitado cariño está siempre presente.

A:

Profesora María de Jesús Navarro de Arana (q.e.p.d.),  
ha sido un ejemplo de integridad moral y de fortaleza  
ante las adversidades.

A:

Sr. Fortino Castro Aguilar (q.e.p.d.), ejemplo de tra  
bajo y honradez.

A mis maestros:

Ing. Enrique García Galeano, Profesor de Tecnología de Alimentos y asesor de este trabajo.

A quien expreso mi agradecimiento por su valiosa coperación.

Profesora Ninfa Guerrero de Callejas.

Agradecido por sus comentarios y valiosos consejos.

I. Q. Emilio Barragán Hernández, maestro en Enzimas de Uso Alimentario. Con mi reconocimiento a su coperación y desinteresadas orientaciones.

# I N D I C E

Pág.

## CAPITULO:

I.-	Objetivo .....	2
II.-	Introducción .....	4
III.-	Materiales y Métodos .....	46
IV.-	Resultados .....	62
V.-	Discusión y Resultados .....	139
VI.-	Resumen .....	143
VII.-	Bibliografía .....	146

I.- OBJETIVO.

Los objetivos de la investigación fueron:

- A) Producir alfa-amilasa mediante un proceso fermentativo, usando una cepa de Aspergillus oryzae, en cultivo sumergido.
- B) Ensayar métodos para concentrar y purificar la alfa-amilasa producida.
- C) Caracterizar la alfa-amilasa fúngica producida.
- D) Caracterizar alfa-amilasa comercial de Bacillus subtilis.
- E) Comparar las características cinéticas de la alfa-amilasa fúngica, con las de la alfa-amilasa bacteriana.

## II.- INTRODUCCION.

Las enzimas fueron usadas de diferentes maneras, - muchísimos años antes de que fueran reconocidas como substancias químicas definidas. Por ejemplo, su aplicación - en fermentación precede al conocimiento de su existencia en las células de organismos vivos. Procesos como la elaboración de pan, vino, alcohol, vinagre y encurtidos son conocidos desde la antigüedad (Aurand, L.N., y Woods, - A. E. 1973). En México, se tiene noticia de la práctica - de los primeros pobladores de la región de envolver las - carnes en hojas de papaya o de cuaguayote con lo que conseguían, de una manera natural, el ablandamiento de las - diferentes carnes consumidas (Del Castillo, L.M. 1975).

A pesar de estas y muchas otras evidencias, la Enzimología, ciencia que estudia las enzimas, ha tenido un desarrollo relativamente reciente. El nacimiento de esta ciencia se ubica en los primeros años del siglo próximo - pasado, aunque es importante señalar que su más rápido - crecimiento se ha experimentado en los últimos 45 años.

El primer reconocimiento claro de una enzima fué - hecho por Payen y Persoz en 1833, cuando encontraron que una fracción precipitada con alcohol de un extracto de - malta contenía una sustancia termolábil, la cual convertía al almidón en azúcar. Esta sustancia, hoy más conocida como amilasa, fué denominada diastasa por Payen y Persoz, debido a su capacidad para separar dextrinas solubles de las cubiertas insolubles de granos almidonosos. - Fué hasta 1878 cuando Küne propuso el uso de la palabra ENZIMA, la cual significa: "En levadura" (Whitaker, J. R. 1972).

Debido a los trabajos de Payen y Persoz, las enzimas conocidas como amilasas constituyen el primer grupo - de enzimas conocidas como tales. A este respecto, Kirchhoff en 1811 describió los factores causantes de la digestión del almidón en extractos de trigo, en 1831 Leuch, -



E. F., en saliva, en 1833 Payen y Persoz en malta, en 1846 Magendine, N., en sangre y en 1885 Atkinson, R.W., en Aspergillus oryzae.

Märker en 1879, fué, aparentemente, el primero en proponer que podrían existir dos fermentos diastásicos; uno que producía una cantidad mayor de dextrina que de maltosa, y otro que, inversamente, producía una cantidad relativamente mayor de maltosa que de dextrina. (Fischer, E.H., y Stein, E.A. 1960).

Los polisacáridos son mejor almacenados que sus productos de degradación de bajo peso molecular, debido a que son menos solubles, y a que cuando están en solución su presión osmótica es tan baja que su posible acumulación en las células no produce hipertonicidad. Sin embargo, antes de que los polisacáridos puedan llevar a cabo su función, de fuente de energía para el organismo animal, vegetal o microbiano deben ser convertidos en unidades de monosacáridos. La escisión de los enlaces glucosídicos es llevada a cabo en los sistemas biológicos por dos mecanismos generales. Un mecanismo es la escisión hidrolítica del enlace glucosídico, mientras el otro mecanismo consiste en una "fosforólisis" del enlace glucosídico (Aurand, L.N., y Woods, A.E. 1973).

El término amilasa ha sido usado para designar a las enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces alfa-1-4-glucosídicos de polisacáridos, tales como almidón, glucógeno o productos de la degradación de los mismos. Puesto que la reacción que cataliza una amilasa puede llevarse a cabo por diferentes mecanismos, suelen clasificarse en dos grandes grupos:

**ENDOAMILASAS.** Estas amilasas actúan aleatoriamente sobre los enlaces alfa-1-4-glucosídicos, permanen-

ciendo sin ser hidrolizados los enlaces alfa-1-6-glucosídicos, los cuales constituyen los puntos de ramificación de glucógeno y amilopectina. Como resultado de la hidrólisis se produce una rápida disminución de la viscosidad y del peso molecular promedio del sustrato. El modo de acción hidrolítica de las endoamilasas, sobre los enlaces alfa-1-4-glucosídicos del sustrato es una escisión interna. Los productos iniciales de la hidrólisis son oligosacáridos (dextrinas), los que posteriormente son degradados a maltosa, glucosa, isomaltosa, y productos ramificados de bajo peso molecular. Ver figuras 1, 2 y 3. Teóricamente, las escisiones son aleatorias, aunque los esquemas de acción hidrolítica de varias amilasas, particularmente de microorganismos, muestran características y patrones de productos reproducibles.

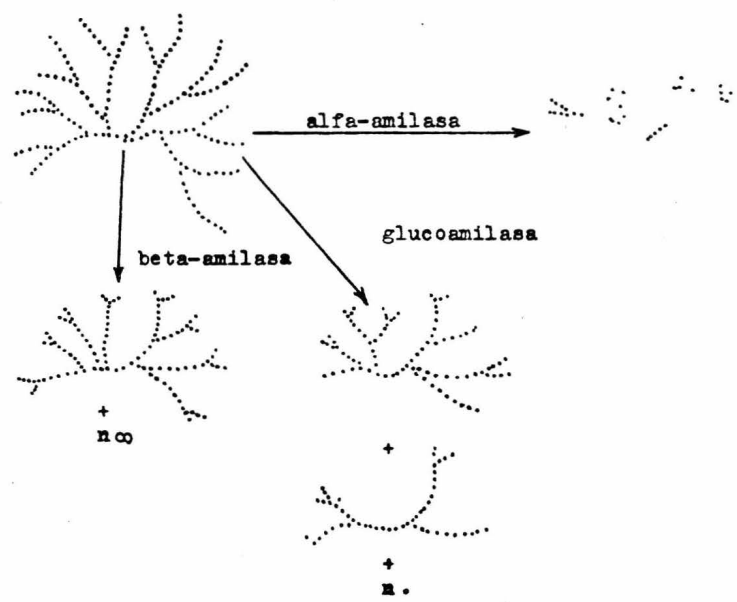
Se conoce un tipo de endoamilasas, denominadas alfa-amilasas, puesto que el grupo hemiacetálico que se libera en la hidrólisis se encuentra en la configuración óptica alfa. De acuerdo a la nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica, las alfa-amilasas se clasifican como alfa-1-4-glucan 4-glucano-hidrolasa, E.C.3.2.1.1.

**EXOAMILASAS.** Estas amilasas tienen la capacidad de hidrolizar los polisacáridos a partir de los extremos no reductores de la cadena polisacárida, operándose el proceso de hidrólisis de una manera regular, ya sea hidrolizando todos los enlaces glucosídicos para producir exclusivamente glucosa, o hidrolizando enlaces alternativamente para producir maltosa. La enzima que produce sólo glucosa se conoce como glucoamilasa o gamma-amilasa (alfa-1-4-glucan glucohidrolasa E.C.3.2.1.3). La acción de glucoamilasa sobre una cadena disminuye marcadamente cuando el polisacárido contiene enlaces alfa-1-6-glucosídicos, como en amilopectina y glucógeno.

8370

ND

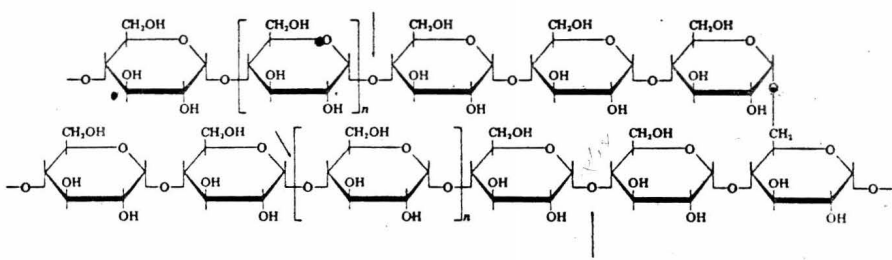
FIGURA I. Esquema de la amilopectina y representación de la acción de las diferentes amilasas.



Fuente: WHITAKER, J.R. (1972). "Principles of Enzymology for the Food Sciences". Marcel Dekker, Inc. New York, USA.

6570 n2

FIGURA 2. ESQUEMA DE LA HIDROLISIS DEL ALMIDON MEDIANTE ALFA-AMILASA.

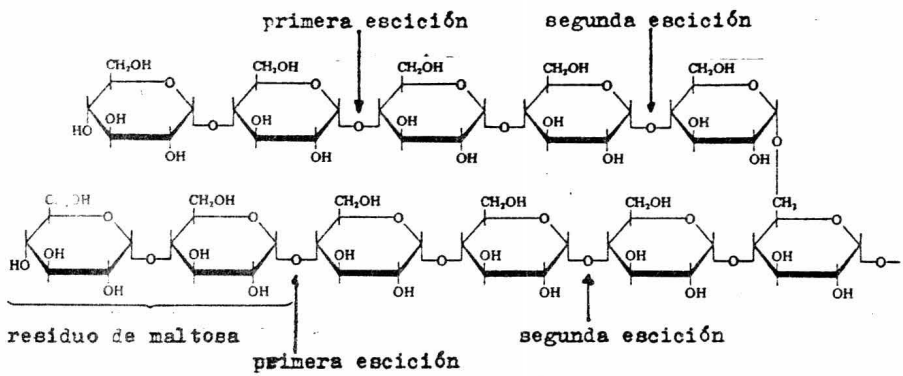


(Las flechas indican los puntos de hidrólisis)

Fuente: AURAND, L.N., and Woods, A.E. (1973). "Food Chemistry". The AVI Publishing Co., Inc. Westport, Conn., U.S.A.

ESTO NO

FIGURA 3. ESQUEMA DE LA HIDROLISIS DEL ALMIDON MEDIANTE BETA-AMILASA.



Fuente: AURAND, L.N., and Woods, A.E. (1973). "Food Chemistry". The AVI Publishing Co., Inc. Westport, Conn., U.S.A.

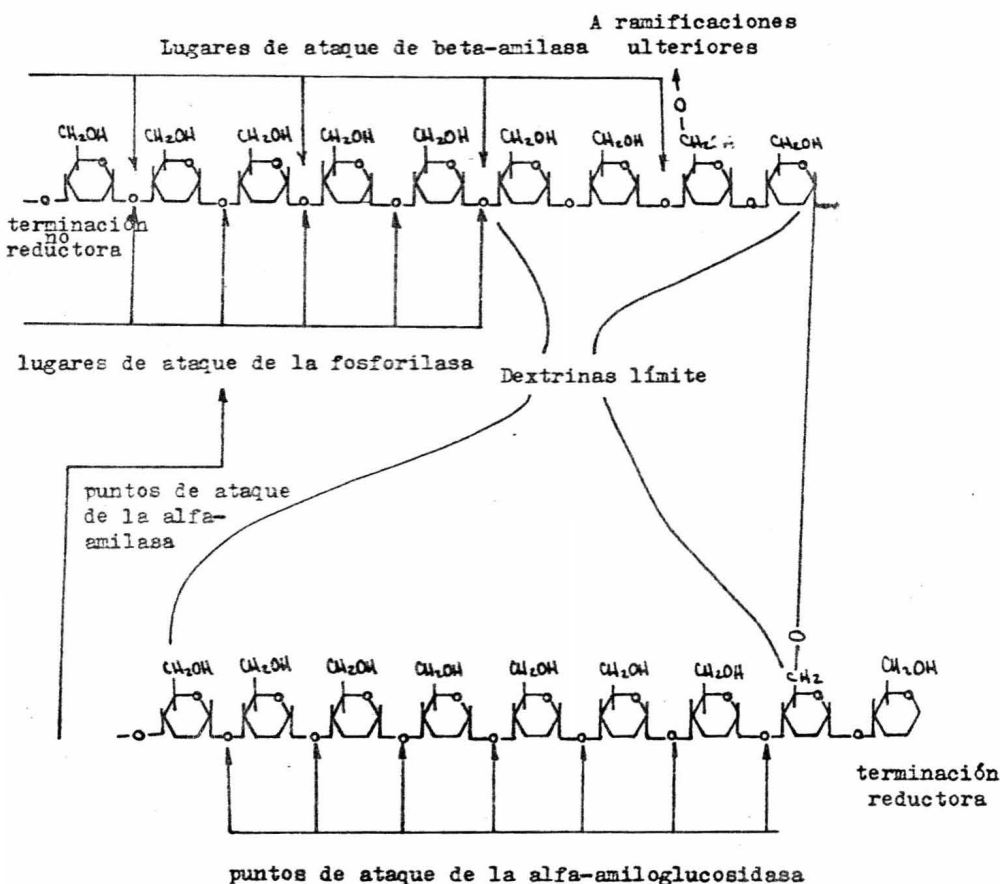
La enzima que produce maltosa se denomina beta-amilasa (alfa-1-4-glucan maltohidrolasa EC.3.2.1.2). Cuando glucoamilasa o beta-amilasa actúan sobre el sustrato, la acción se detiene en el primer punto de ramificación, debido a que no pueden hidrolizar enlaces alfa-1-6-glucosídicos, produciéndose de esta manera "dextrinas límites". Ver figura 4 (Whitaker, J.R. 1972).

Los sustratos naturales de amilasa (almidón, glucógeno o productos de ramificación de ambos), tienen funciones nutricionales en animales, vegetales y microorganismos. Así, el almidón en las plantas y el glucógeno en los animales son los carbohidratos de reserva; fuente de energía para el funcionamiento metabólico.

Las unidades fundamentales de los almidones (de varias fuentes) y del glucógeno es la D-glucosa; es el único monosacárido que se obtiene durante la hidrólisis total de estos polisacáridos. Los diferentes almidones están formados por la amilosa y la amilopectina, que se encuentran presentes en cantidades variables. También el grado de polimerización de los polisacáridos es variable (número de moléculas de D-glucosa). La amilosa da una coloración azul con el yodo, mientras la amilopectina da una coloración que va del rojo al púrpura. La amilosa tiene una estructura lineal debido a la unión de unidades de D-glucosa, a través de enlaces alfa-1-4-glucosídicos, mientras que la amilopectina tiene una estructura ramificada, formada por cadenas de glucosa unidas por enlaces alfa-1-4-glucosídicos, que a su vez están unidas entre sí por enlaces alfa-1-6-glucosídicos, y desde donde puede obtenerse por hidrólisis el disacárido isomaltosa. Ver figura 5 (Conn, E.E., y Stumpf, P.K. 1972).

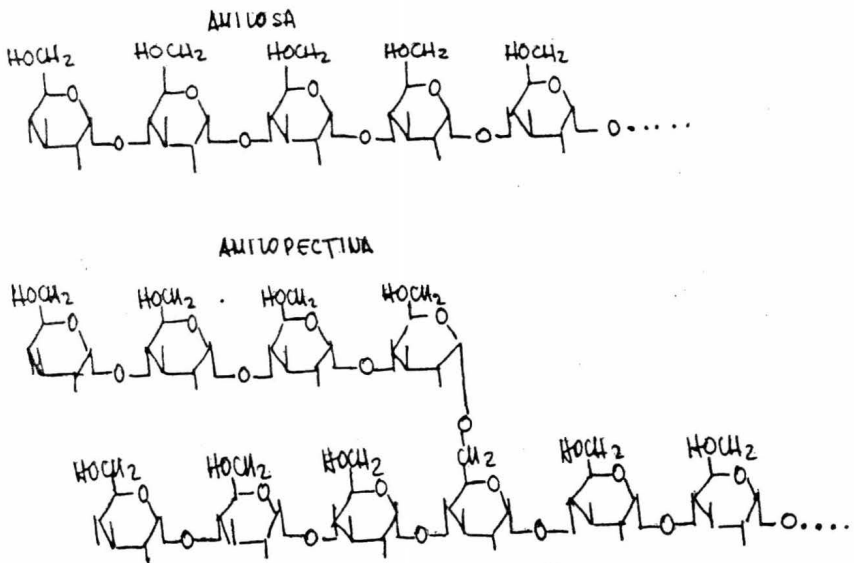
La alfa-amilasa se encuentra en animales (en la ptialina de la saliva, en la pancreatina), en vegetales]-

FIGURA 4. PUNTOS DE ATAQUE DE LAS DISTINTAS ENZIMAS AMILOLITICAS EN UNA MOLECULA DE AMILOPECTINA.



Fuente: BRAVERMAN, J.B.S. (1967). "Introducción a la Bioquímica de los Alimentos". Ediciones Omega, S.A. España.

FIGURA 5. Fórmulas estructurales de las moléculas de amilosa y amilopectina.



Fuente: COUV, E.C., y STUMPF, P.K. (1972). "Bioquímica Fundamental".  
segunda edición. Editorial Limusa-Wiley, México, D.F.



(particularmente en granos malteados) y en microorganismos (hongos y bacterias). Los primeros preparados enzimáticos que fueron utilizados industrialmente provenían de tejidos vegetales o de glándulas animales. Diferentes factores han motivado el gran interés que actualmente han cobrado los procesos fermentativos para la producción industrial de enzimas, y entre los más importantes se encuentra la gran potencialidad evidenciada por los microorganismos.

Aunque actualmente se obtienen grandes cantidades de enzimas a partir de fuentes animales y vegetales, existen razones tecno-económicas para prever un futuro promisorio de las enzimas de origen microbiano. Entre las ventajas que presenta el desarrollo de procesos fermentativos, para la producción de enzimas, se encuentran:

- a) Tiempos de generación más cortos.
- b) Requerimiento de un espacio menor por unidad de masa de enzima producida.
- c) Potencialidad ilimitada en cuanto a la disponibilidad de nuevas enzimas.
- d) Mayores facilidades y ahorro en las etapas de concentración y purificación, particularmente para enzimas extracelulares.

Una desventaja potencial es el que se produzcan materiales tóxicos difíciles de eliminar del extracto crudo.

La primera etapa en la producción comercial de una enzima, mediante un proceso fermentativo, es la selección del microorganismo. Además de la capacidad de producir la enzima deseada y con buenos rendimientos, el microorganismo debe presentar características importantes como son la de no ser patógeno, no producir sustancias tóxicas, -

ser estable, etc. En general, las cepas que producen altos rendimientos de alfa-amilasa se encuentran comprendidas dentro del género Aspergillus, como Aspergillus oryzae y Aspergillus niger. Otros géneros importantes son Mucor y Monilia [Mazza, L. A., y Balatti, A.P. 1970].

Una vez que la cepa ha sido seleccionada, debe ser mantenida en estado puro y con la misma capacidad productora, lo que implica el manejo del cultivo bajo condiciones rígidamente controladas. Para llenar este requisito se han empleado varias técnicas, entre las que se cuentan la congelación de una suspensión de esporas en presencia de un material inerte, preservación bajo una capa de vaselina estéril (en esta forma la actividad metabólica es marcadamente disminuida). Este último método es indicado principalmente para aquellos microorganismos que no esporulan abundantemente, siendo incapaces de mantener su viablez cuando se someten a la congelación.

La mayor parte de las cepas con alta capacidad productora, que actualmente se utilizan en la industria, provienen de mutantes que han sido obtenidas aplicando diferentes técnicas de mutación, como son:

- (a) Métodos Físicos (Ultrasonido)
- b) Métodos Químicos (Represión catabólica)
- c) Métodos de recombinación genética (Pontecorbo, G., Roper, J.A., y Forbes, E. 1953).

\* Muchas enzimas como la alfa-amilasa son aún producidas en cultivos en superficie. Actualmente se prefiere trabajar en cultivo sumergido por las numerosas ventajas que ofrece esa técnica. Entre los métodos de producción de alfa-amilasa cabe mencionar, por su gran difusión, el cultivo en bandejas de alta relación superficie/volumen, utilizando medios semisólidos. Las bandejas se disponen una sobre otras, haciendo pasar aire estéril entre las -

mismas, con el objeto de facilitar la respiración celular y mantener la temperatura del proceso dentro de los límites deseados. Este proceso presenta desventajas en relación al proceso sumergido. Así, por ejemplo, es muy difícil mantener la humedad del aire que se introduce a la cámara de fermentación y las condiciones de esterilidad del sistema, además es muy difícil mantener la temperatura - dentro de los límites requeridos. Finalmente, la mano de obra es superior en este proceso con relación al sistema sumergido.

Otro método que ha sido utilizado, aunque con menos aplicación, es el desarrollo del cultivo en medios semisólidos en tanques giratorios. Esta técnica presenta el inconveniente de que sólo el 30% del volumen del tanque - es aprovechable. (Arima, K. 1964).

Actualmente la producción de amilasas fúngicas, en proceso sumergido, se realiza en fermentadores de gran capacidad, generalmente construidos de acero inoxidable y provistos de todos los controles y accesorios necesarios para el proceso, como agitación, aereación, control de la temperatura, espuma, etc. La primera etapa del proceso - corresponde a la preparación del inóculo, la cual se lleva a cabo con agitadores y equipos similares al tanque de producción, pero en escala menor. El objeto principal del tanque inóculo es obtener un desarrollo vegetativo abundante, pudiendo ser la composición del medio y las condiciones operativas diferentes a las utilizadas en el tanque de fermentación. La siembra del tanque inóculo - puede efectuarse con una suspensión de esporas o bien con un desarrollo vegetativo proveniente de una etapa anterior.

Durante los procesos fermentativos normalmente se efectúan determinaciones de concentración celular, pH, composición del medio, actividad enzimática, control de -

esterilidad, etc. También es de gran utilidad para este proceso la evaluación de las condiciones de aereación de el medio de cultivo (potencia de agitación, flujo y presión del aire, diseño del equipo, características reológicas del medio de fermentación, etc.), es importante disponer de técnicas que permitan evaluar el grado de aereación de un medio de cultivo. Un método de simple realización consiste en establecer la relación consumo de oxígeno/demanda de oxígeno para el microorganismo que se trabaja. De esta manera, se pueden tener resultados donde la máxima producción de alfa-amilasa, se tiene cuando las condiciones del proceso son tales que no es igual a la unidad la relación consumo de oxígeno/demanda de oxígeno. Es decir, se puede tener el caso, y es muy frecuente, en que la mayor producción de enzima se tiene cuando no se satisface la máxima capacidad respiratoria del microorganismo (Mazza, L., Balatti, A., y Cuevas, C. 1967).

En cuanto al medio es importante señalar que la composición del mismo puede decidir el éxito del proceso. Un medio de producción debe contener:

- a) Una fuente de energía.
- b) Una fuente de nitrógeno.
- c) Factores de crecimiento, que incluyen vitaminas y aminoácidos.
- d) Un inductor.
- e) Sales minerales.

El balance de esos componentes y la relación fuente de carbono/fuente de nitrógeno es de fundamental importancia en la regulación del pH y la producción de la enzima.

La fuente de carbono generalmente utilizada en este proceso es el almidón, el que cumple una doble finali-

dad ya que actúa como fente de carbono y como un induc--  
tor de la enzima. No obstante, se han utilizado otras -  
fuentes de carbono como maltosa, isomaltosa, sacarosa y -  
aún la glucosa.] Con respecto a esta última fuente de car  
bono, Banks, G.T., Binns, F., y Cutcliffe, R.L. (1967), -  
se le considera como inhibidor de la síntesis de la enzi-  
ma. Este hecho se atribuye a que es rápidamente metaboli-  
zada transformándose en metabolitos intermedios. Los com  
puestos con uniones alfa-1-4-glucosídicas son buenos in--  
ductores de alfa-amilasa.

Con respecto a las fuentes nitrogenadas que se -  
usan puede mencionarse algunas sales inorgánicas como sul  
fato de amonio, nitrato de amonio, acetato de amonio, -  
etc., sin embargo, formas de nitrógeno más complejas como  
hidrolizados de proteínas o harinas (hidrolizados de ca-  
seína, harina de soya, harina de semilla de algodón, -  
etc.) dan mayores rendimientos. La fuente nitrogenada po  
sibilita no sólo el crecimiento celular sino que además -  
aporta aminoácidos que intervienen en la biosíntesis de -  
la enzima.

Entre los constituyentes inorgánicos los medios de  
cultivo llevan en su composición sulfato de magnesio, fos  
fatos, hierro, etc. Es interesante destacar la influencia  
de pequeñas cantidades de cloruro de sodio y de cloruro -  
de potasio.

El pH de los medios de fermentación constituye un-  
parámetro muy importante ya que la biosíntesis de la enzi-  
ma se produce dentro de ciertos valores de pH. Dada la -  
importancia que reviste esta variable es necesario proce-  
der a un correcto balance de los medios, y especialmente-  
en lo que se refiere a la naturaleza de la fuente nitroge-  
nada, y a la relación carbono/nitrógeno. Con el fin de -  
regular el pH se suele incorporar a los medios fosfato y

carbonato de calcio. Dado que el proceso de obtención de alfa-amilasa en sistema sumergido es muy susceptible a las contaminaciones, se hace necesario extremar las precauciones para mantener los cultivos libres de otros microorganismos. En este sentido se ha mencionado la incorporación a los medios de cultivo de bifluoruro de amonio y de pentaclorofenato de sodio. También se ha utilizado con éxito la mezcla de benzoato y borato de sodio. (Mazza, L.A., y Balatti, A.P. 1970).

El primer paso en toda operación de recuperación de enzima, es obtener una solución filtrada a partir de los medios de fermentación. Esta etapa inicial de la recuperación debe realizarse lo más rápidamente posible para evitar el desarrollo de otros microorganismos, y la inactivación de la enzima. La solución obtenida o extracto crudo se puede concentrar por evaporación al vacío y baja temperatura o por ultrafiltración. A partir del extracto crudo pueden precipitarse algunas proteínas mediante sales o solventes. Esta etapa se debe llevar a cabo dentro de límites de pH propios para cada enzima y es común, además, agregar estabilizadores como protectores de la misma. Un aspecto muy importante que siempre debe tenerse presente es la elección adecuada del equipo de recuperación. En general, se usan equipos vidriados o de acero inoxidable, para evitar la incorporación de metales pesados que podrían inactivar la enzima. El procedimiento de recuperación depende no solo de la enzima, sino también del uso a que será destinada. Cuando no se requiere un alto grado de pureza, se llega a la obtención de concentrados de determinado título; en caso contrario se debe continuar la purificación hasta el punto que sea requerido (Mazza, L.A., y Balatti, A.P. 1970).

La extracción de alfa-amilasa ~~tal como la describe~~ Lockwood (1961) se realiza separando el micelio por fil--

[tración. El filtrado (extracto crudo) se enfría rápidamente. Generalmente se realiza una nueva filtración antes de concentrar el extracto crudo, lo que se hace por evaporación al vacío a temperaturas no mayores de 50°C. En estas condiciones la pérdida de la actividad enzimática es despreciable. La concentración se lleva hasta 1/4 a 1/6 del volumen inicial, y la enzima se precipita con acetona fría o alcohol insopropílico a un pH de 7.5 a 8.5. El precipitado, luego de separarse por filtración, se seca al vacío y se lleva a un título adecuado por mezclado con materiales inertes.]

[El contenido de humedad del producto final es muy importante, y nunca debe ser superior al 13% para asegurar una buena conservación. El contenido de humedad es sólo uno de los aspectos que debe controlarse en el producto terminado, el que además, debe controlarse para su tamaño de partícula, actividad proteolítica, no contener microorganismos y no ser tóxico] (Mazza, L.A., y Balatti, A.P. 1970).

[Las amilasas bacterianas y fúngicas, han sido objeto de estudios de tipo químico y fisicoquímico en virtud de varios factores. En principio se tiene el hecho de que se dispone de ellas en grandes cantidades y con un buen estado de homogeneidad, y que además, desde hace muchos años han tenido una amplia aplicación industrial y una considerable importancia económica. Esto ha motivado que los estudios sobre alfa-amilasa y amilasas en general tengan un interés académico y de aplicación inmediata.]

[La mayoría de las alfa-amilasas más comunes han sido cristalizadas y purificadas a la fecha. Entre ellas se encuentran las procedentes de:]

- [Bacillus subtilis] (Fukumoto, J., y Okada, S. 1963).

- Saliva humana (Musses, J. 1953).
- Páncreas humano (Fischer, E.H., Duckert, F., y Bernfeld, P. 1950).
- Páncreas de cerdo (Caldwell, M.L., et al. 1952).
- Páncreas de rata (Heatley, N.G. 1958).
- Bacillus coagulans (Campbell, L.L. 1954).
- Aspergillus oryzae (Taka-amilasa) (Akabori, S., Ikenaka, T., y Hagihara, B. 1954).
- Aspergillus candidus (Takaoka, K., et al. 1952).
- Pseudomonas sacchariphila (Markovitz, A., Klein, H.P., y Fischer, E.A. 1956).
- Bacillus polymyxa (Roby, J., y French, D. 1964).
- Bacillus macerans (De Pinto, J.A., y Campbell, L.L. 1968).
- Bacillus amyloliquefaciens (Welker, N.E., y Campbell, L.L. 1967).
- Aspergillus niger (Minoda, Y., et al. 1968).
- Bacillus stearothermophilus (Ogasahara, K., Imanishi, A., e Isemura, T. 1970).
- Cebada malteada (Schwimmer, S., y Balls, A.K. 1949).

En la mayoría de los casos los procedimientos de purificación involucran precipitación con solventes o sales. Otras técnicas usadas para purificación son:

- a) Precipitación con rivanol (2-etoxi-6,9-diamino acridio-lactato).
- b) Adsorción sobre almidón o derivados del almidón.
- c) Cromatografía en columna de intercambio iónico.



d) Adsorción de los pigmentos cafés, los cuales son siempre encontrados en los extractos bacterianos, sobre un precipitado de sulfato de bario formado directamente en la solución (Fischer, E.H., y Stein, E.A. 1968).

En los cuadros 1, 2 y 3 se muestran métodos para la purificación de alfa-amilasa de Bacillus subtilis y Aspergillus oryzae.

El procedimiento de purificación de alfa-amilasa de Bacillus subtilis involucra una adsorción en almidón, decoloración del pigmento obscuro con una resina de intercambio iónico, precipitación con sulfato de amonio y cristalización con acetona. La purificación debe llevarse a cabo en presencia de di-isopropilfosfofluorhidrato a fin de proteger la amilasa de las proteasas presentes en el extracto bacteriano.

La purificación de Taka-amilasa A a partir de taka-diestasa, emplea precipitación con sulfato de amonio, precipitación con rivanol; y cristalización a partir de acetona y agua. En la purificación, la diálisis de la fracción con sulfato de amonio debe llevarse a cabo usando una bolsa de colodión en lugar de celulosa, debido a la presencia de una alta actividad de celulasa en la fracción (Akabori, S., Hagihara, B., e Ikenaka, T. 1954). Toda, et al (1963) establecieron un método más conveniente y rápido de purificación, usando DEAE-celulosa.]

La cristalización de alfa-amilasa es más difícil de hacer después de varias cristalizaciones; comportamiento atribuible a la pérdida de varios iones metálicos divalentes, lo que redundaría en un aumento en la solubilidad de la proteína. La adición de iones  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$  ó  $\text{Ni}^{++}$  ayuda a una rápida cristalización.

CUADRO 1. PURIFICACION DE ALFA-AMILASA DE Bacillus subtilis.

Extracto crudo (medio filtrado).

Adsorción en almidón (0.3 saturado con sulfato - de amonio)

Enzima adsorbida sobre almidón.

Elución con  $\text{NaHPO}_4$ , M/30.

Dialisis contra agua de la llave

Solución dializada.

Decoloración con resina Duolita A2.

Solución decolorada.

Precipitación con sulfato de amonio (0.7 saturada)

Disolver en acetato de calcio 0.01 M

Dializar contra acetato de calcio M/500

Solución dializada.

Adición de acetona (60%, 0°C)

Ajustar pH a 6.0

Refrigerar

Cristales

Fuente: TAKAGI, T., TODA, H., and ISEMURA, T. (1970). -  
 "Bacterial and Mold Amylases" in "The Enzymes" -  
 edited by Boyer, P. D., Lardy, H., and Myrbäck, K.  
 Academic Press. New York, USA.

CUADRO 2. PURIFICACION DE TAKA-AMILASA A PARTIR DE TAKA-DIASTASA

Taka-diastasa (30 gramos).

Extracto acuoso (150 ml)

Adición de acetato de calcio 0.25M (150 ml)

Filtración

Filtrado.

Diluir con igual volumen de agua

Precipitar con sulfato de amonio 3/4 saturado

Centrifugar

Precipitado.

Disolver en agua

Dializar contra agua de la llave

Solución dializada.

Adición de solución de rivanol (1.0% (0.04 vol.)

Filtrar

Filtrado.

Adición de rivanol 11% (0.06 vol.)

Precipitado.

Disolver en regulador de acetato 0.5M, pH 6.0

Adición de arcilla ácida (10.0 gramos), filtrar

Filtrado.

Adición de acetona (60.0%)

Centrifugar

Precipitado.

Disolver en acetato de calcio 0.02M

Adición de acetona fría hasta turbidez ligera

Refrigeración

Taka-amilasa A, cristales (0.8 gramos).

Fuente: TAKAGI, T., TODA, H., and ISEMURA, T. (1970). "Bacterial and Mold Amylases", in "The Enzymes" edited by Boyer, P.D., Lardy, H., and Myrbäck, K. Academic Press. New York, USA.

CUADRO 3. PURIFICACION DE TAKA-AMILASA A, A PARTIR DE -  
TAKA-DIASTASA.

Taka-diastasa (30 gramos).

Disolver en 150 ml de agua

Adicionar solución de acetato de calcio M/4, 150 ml.

Filtrar

Filtrado.

Dializar contra agua de la llave

Solución dializada.

Adicionar acetato de sodio hasta 0.1 M

Suspender 20 gramos de DEAE-celulosa.

Ajustar pH a 7.5. Mantener en cuarto frío durante 2 horas.

Filtrar

Lecho de DEAE-celulosa

Lavar con acetato de sodio 0.1M

Lecho de DEAE-celulosa.

Extraer con acetato de sodio 0.2 M

Extracto.

Adicionar acetato de calcio hasta M/4

Adicionar acetona hasta 60%

Centrifugar

Precipitado

Disolver en acetato de sodio 0.1 M

Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

Taka-amilasa A purificada.

Fuente: Toda, H., and Akabori, S. (1963). Journal of Biochem (Tokyo).

[Para examinar la homogeneidad de una preparación de amilasa se puede usar un método de electroforesis en gel de poliacril-amida o una cromatografía analítica de intercambio iónico.]

[Por lo que respecta a la estructura primaria de las diferentes alfa-amilasas, la de Bacillus subtilis difiere de otras, particularmente de la de Aspergillus oryzae, en que no tiene sulfhidrilos ni puentes disulfuro, esto es, no contiene residuos de cisteína ni de cistina. La alfa-amilasa de Aspergillus oryzae tiene cantidades bajas de residuos de aminoácidos básicos, lo cual contribuye a su bajo contenido relativo de nitrógeno y a su carácter más ácido. La alta proporción de tirosina, de otros aminoácidos hidroxilados, aminoácidos dicarboxílicos y tal vez amidas pueden formar puentes intramoleculares de hidrógeno en la molécula de alfa-amilasa de Aspergillus oryzae, confiriéndole una estructura muy compacta. Esto último podría explicar la baja levorotación, bajo volumen específico parcial, extraordinaria fuerza para enlazar el calcio y elevada resistencia a cambios en pH, temperatura y proteólisis de la molécula de alfa-amilasa de Aspergillus oryzae.

Por el método de Sanger usando 2,4-dinitrofluorobenceno, se ha demostrado que el grupo amino terminal de la molécula de taka-amilasa A corresponde a un residuo de alanina. Para esta misma amilasa, se determinó por el método de hidrazinólisis la existencia de tres grupos carbono terminales correspondiendo a residuos de serina, alanina y glicina (Akabori, S., et al. 1956). Investigaciones más recientes con técnicas de digestión con carboxipeptidasa A e hidrazinólisis afirman que el grupo carbono terminal corresponde sólo a un residuo de serina (Narita, K., et al. 1966). De acuerdo a esto, la molécula de taka-amilasa es una cadena con un residuo de

{alanina en el amino terminal y un residuo de serina en - el carbono terminal.}

[Para alfa-amilasa de Bacillus subtilis se ha determinado por el método de Sanger que el amino terminal corresponde a un residuo de valina, y el carbono terminal a un residuo de lisina. Este carbono terminal se ha determinado por la técnica del hidrógeno marcado (Kogima, H., y Sugae, K. 1968). Radichevitch, I., et al (1959) estudiaron los grupos esenciales de taka-amilasa A, acetilando la proteína con anhídrido acético. Los resultados indican que la proteína casi se inactivó cuando fueron sustituidos aproximadamente la mitad de los grupos amino libres. Por confirmación de resultados previos se concluyó que la presencia de grupos amino libres es necesaria para la actividad. Los estudios de Caldwell, M.L., et al (1945), usando cloruro fenil mercúrico, p-mercuribenzoato y yodoacetamida, mostraron que los grupos SH no son esenciales para la actividad de taka-amilasa.]

{La presencia de componentes no proteínicos en la molécula de alfa-amilasa de Aspergillus oryzae, ha sido estudiada por Haurahan, V.M., y Caldwell, M.L. (1953), quienes determinaron que unido a la molécula de proteína se tiene una molécula de carbohidrato, constituida por 8 moles de manosa, una mol de xilosa y 2 moles de hexosamina por cada mol de alfa-amilasa. Akabori, S., et al (1955) sugirieron que la fracción de carbohidrato en la molécula de alfa-amilasa no participa de manera directa en la actividad enzimática. En 1955, Hanafusa, H., Ikenaka, T., y Akabori, S., produjeron alfa-amilasa de Aspergillus oryzae sin la fracción de carbohidrato.]

[Las alfa-amilasas han sido clasificadas como meta loenzimas que requieren calcio como cofactor. Stein, E.A., et al en 1964 reportaron la eliminación total de calcio.]

{de la molécula de alfa-amilasa de Bacillus subtilis, secuestrando el catión con EDTA o por electrodiálisis. El resultado de las investigaciones revela una desnaturalización reversible de la molécula de alfa-amilasa. La molécula de taka-amilasa A resultó ser extraordinariamente resistente a la eliminación de calcio. En este sentido, la velocidad de eliminación del calcio depende del origen de la amilasa presentándose el siguiente patrón: }

[ Mamífero    Bacteriana    Fúngica

←----- velocidad de eliminación -  
del calcio.

-----> fuerza de unión del calcio  
a la molécula de enzima }

Hsiu, J., et al en 1964 {estudiaron las propiedades catalíticas de alfa-amilasa de Bacillus subtilis durante la eliminación progresiva, por secuestro o electrodiálisis, del calcio unido a la enzima. En la eliminación del calcio se observó una pérdida de la actividad que podría ser cuantitativamente recuperada restaurando el catión a la enzima. }

{ Las enzimas bacterianas requieren 4 o más átomos--gramo de calcio por mol de enzima para su total actividad. Se ha sugerido que el calcio forma enlaces intramoleculares similares en su función a los enlaces disulfuro. }

[La taka-amilasa A fija 10 átomos--gramo de calcio - por mol de enzima, pudiendo ser eliminados contra acetato de sodio 0.02 M, mediante diálisis, 9 de los 10 átomos--gramos de calcio. Estos 9 átomos--gramos eliminados están débilmente unidos, y al eliminarlos no hay un cambio en la actividad enzimática (Oikawa, A., y Maeda, A. 1957). - Estos átomos de calcio estabilizan la molécula de enzima contra la desnaturalización. El átomo grammo de calcio no

dializable está tan específica y fuertemente unida que no puede <sup>de la coise</sup> deslizarse contra EDTA y pH de 7-9 durante 150 horas a baja temperatura (Stein, E.A., et al. 1964). Kato, et al en 1967 demostraron que el átomo de calcio fuertemente unido puede ser eliminado contra EDTA a pH de 8 y - 50°C. La actividad enzimática se pierde, pero se recupera con la adición de calcio. Toda, H., y Narita, K. (1967) demostraron que un átomo de calcio en taka-amilasa podía ser reemplazado por otro catión divalente, como mag nesio, bario o estroncio, sin causar un cambio significativo en la actividad de la amilasa.]

[ El efecto directo que tiene el catión sobre la alfa-amilasa es el de estabilizarla. Ya en 1901, Wallers-- tein, patentó el uso de las sales de calcio para aplica-- ción en cervecería. Actualmente el catión calcio se adiciona rutinariamente durante la purificación de alfa-ami-- lasa con objeto de estabilizar la enzima y provocar una - mejor cristalización.] (Fischer, E.H., y Stein, E.H. - 1960).

[ Los pesos moleculares de alfa-amilasa bacteriana y fúngica varían de 40,000 a 60,000, como se muestra en - el cuadro 4. Los pesos moleculares se han determinado por técnicas de sedimentación y gel filtración.] (Takagi, G., - Toda, H., e Isemura, T. 1970).

Stein, E.A., y Fischer, E.H. (1958) [demostraron - que alfa-amilasa cristalizada de Aspergillus oryzae y de Bacillus subtilis conservan toda su actividad cuando se - incuban con grandes concentraciones de tripsina cristali-- zada. Yamamoto, T. (1955) trabajando con alfa-amilasa - cristalizada de Bacillus subtilis la expuso durante lar-- gos períodos de tiempo a la acción, por separado, de dife-- rentes enzimas proteolíticas como papaína, tripsina, qui-- motripsina, subtilisina y pepsina, observándose que la ac]



CUADRO 4. PESOS MOLECULARES DE ALFA-AMILASAS.

AMILASA	PESO MOLECULAR	METODO
Alfa-amilasa de <u>Bacillus subtilis</u>	48,900 (monómero)	S y D
	96,900 (dímero)	
	47,000 (monómero)	SE
Taka-amilasa A (alfa-ami- lasa de <u>Aspergillus ory- zae</u> )	51,000	S y D
	52,600 <sub>+2,600</sub>	SE
	49,000	GF
	50,000	S y D
Alfa-amilasa ácido esta- ble de <u>Aspergillus niger</u>	61,000	SE
Alfa-amilasa ácido ines- table de <u>Aspergillus ni- ger</u>	61,000	SE
Alfa-amilasa termoesta- ble de <u>Bacillus stearo-- thermophilus</u>	48,000	SE
	52,700 <sub>+2,200</sub>	SE

S y D: Constantes de sedimentación y difusión.

SE: Equilibrio de sedimentación.

GF: Gel filtración.

Fuente: TAKAGI, T., TODA, H., and ISEMURA, T. (1970). -  
"Bacterial and Mold Amylases" in "The Enzymes" -  
edited by Boyer, P.D., Lardy, H., and Myrbäck, K.  
Academic Press. New York, USA.

tividad de la alfa-amilasa se conservaba. Hagihara, B., - et al (1956) también demostraron que cuando la alfa-amilasa de Bacillus subtilis y de Aspergillus oryzae son tratadas con subtilisina, tripsina y quimotripsina, no solo no conservan su actividad, sino que permanecen totalmente precipitables con ácido tricloroacético.

Este último resultado sugiere que la resistencia - del ataque proteolítico no está restringido al sitio activo, sino que incluye a toda la estructura molecular de la enzima. Por otra parte, las alfa-amilasas desnaturalizadas con calor, ácido o urea son fácilmente digeribles por la subtilisina, lo que se ilustra por su solubilidad completa en ácido tricloroacético.

En la actualidad y en los próximos años, las alfa-amilasas que puedan soportar condiciones extremas de proceso, serán de gran importancia académica, técnica y económica, particularmente en aplicaciones industriales. A la fecha se han estudiado alfa-amilasas ácido y termoestables, debido a que altas temperaturas y pH ácidos son condiciones óptimas para la hidrólisis del almidón. En realidad, el consumo de estas amilasas no es grande, debido a que las alfa-amilasas convencionales son de un precio relativo bajo y generalmente resistentes a las condiciones de proceso, cuando menos durante el tiempo que éste dura. Las alfa-amilasas ácido y termoestables serán más útiles cuando sean unidas a soportes inertes, esto es, cuando se tenga un mayor desarrollo en el prometedor campo de la INMOVILIZACION DE ENZIMAS.

Aparte del interés exclusivamente industrial, las enzimas amilolíticas ácido o termoestables son interesantes desde el punto de vista biológico, en relación a los mecanismos de adaptación de microorganismos a condiciones extremas. En este sentido, las enzimas de microorganismos termofílicos tienen interés en el estudio de la termofili-

Como ya se mencionó, la especificidad de alfa-amilasa es catalizar la hidrólisis de los enlaces alfa-1-4--glucosídicos en polisacáridos o productos de su degradación, permaneciendo el enlace alfa-1-6--glucosídico de glucógeno o amilopectina sin ser hidrolizado. Okada, S., et al (1969) demostraron que la escisión inicial de alfa-amilasa sacarificante de Bacillus subtilis sobre maltodextrina ocurría más rápidamente en el tercer o más interno enlace a partir del extremo no reductor. En el cuadro 5 y 6 se muestra la velocidad relativa de hidrólisis de malto oligosacáridos catalizada por alfa-amilasa de Bacillus subtilis. La alfa-amilasa sacarificante muestra una afinidad por maltooligosacáridos que tienen longitud de cadena  $G_2$  a  $G_{23}$ , mientras que la afinidad de alfa-amilasa licuefactante es marcadamente reducida por oligosacáridos con longitud de cadena menor a  $G_{23}$ .

Matsubara, S., et al (1959) investigaron el efecto de aglicón sobre la velocidad de hidrólisis de maltosidasa mediante taka-amilasa A. Esta enzima cataliza la hidrólisis maltosídica de varias alfa-maltosidas, tal como metil, etil, fenil y p-nitrofenil maltosidasa, esto es, la taka-amilasa A tiene una alta especificidad de aglicón.

La acción de la alfa-amilasa se caracteriza por cambios simultáneos en las siguientes propiedades:

- a) Disminución de la viscosidad.
- b) Incremento en la concentración de grupos reductores.
- c) Cambio en la capacidad para teñirse con yodo.
- d) Cambio en la rotación óptica.

Los métodos diseñados para medir la actividad de alfa-amilasa están basados en alguno de los anteriores fenómenos, y principalmente en alguno de los primeros tres.

CUADRO 5. VELOCIDAD RELATIVA DE HIDROLISIS DE MALTOOLIGO SACARIDOS MEDIANTE ALFA-AMILASA SACARIFICANTE DE Bacillus subtilis.

MALTOOLIGOSACARIDO	CONCENTRACION	VELOCIDAD RELATIVA DE HIDROLISIS
G <sub>2</sub>	0.002 M	0
G <sub>3</sub>	0.002 M	9
G <sub>4</sub>	0.002 M	98
G <sub>5</sub>	0.002 M	72
G <sub>6</sub>	0.002 M	49
G <sub>7</sub>	0.002 M	34
(Maltodextrinas (G23))	0.2%	85
Almidón	0.25%	10

Fuente: TAKAGI, G., TODA, H., and ISEMURA, T. (1970). - "Bacterial and Mold Amylases" in "The Enzymes" - edited by Boyer, P.D., Lardy, H., and Myrbäck, - K. Academic Press. New York, USA.

CUADRO 6. VELOCIDAD RELATIVA DE HIDROLISIS DE MALTOOLIGO SACARIDOS MEDIANTE ALFA-AMILASA LICUEFACTANTE DE Bacillus subtilis.

MALTOOLIGOSACARIDO	CONCENTRACION	VELOCIDAD RELATIVA DE HIDROLISIS
G <sub>15</sub>	0.1	0
G <sub>7</sub>	0.1	1
G <sub>10-12</sub>	0.1	1
G <sub>15-20</sub>	0.1	10
Maltodextrina (G <sub>23</sub> )	0.1	41
Almidón	0.1	100

Fuente: TAKAGI, G., TODA, H., and ISEMURA, T. (1970). - "Bacterial and Mold Amylases" in "The Enzymes" - edited by Boyer, P.D., Lardy, H., and Myrbäck, K. Academic Press. New York, USA.

Sobre esta base, la actividad de alfa-amilasa en ocasiones se expresa como:

- a) Capacidad licuefactante.
- b) Capacidad sacarificante.
- c) Capacidad dextrinificante.

Los grupos reductores son determinados por cualquiera de los métodos siguientes:}]

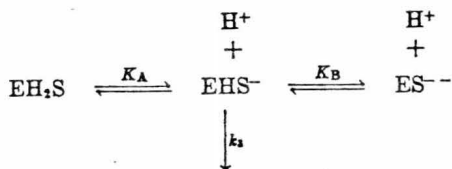
- a) Somogyi-Nelson (Fuwa, H. 1954).
- b) Acido 3,5-dinitrosalicílico (Bernfeld, P. 1951).

La capacidad dextrinificante se determina por el cambio en el color azul que produce el complejo de absorción yodo-amilosa. El sustrato comunmente usado es almidón soluble (amilosa).

A pesar de que las alfa-amilasas con un buen grado de pureza son fácilmente adquiridas, de que esta enzima se encuentra entre las primeras conocidas, de que fué de las primeras usadas en estudios de cinética enzimática, y que una considerable cantidad de estudios se han desarrollado con ella en esa área, es mínimo el conocimiento y además insuficiente, que se tiene del mecanismo de acción de la alfa-amilasa. Este hecho, paradójico, tiene su origen en la complejidad del sustrato y de la reacción misma.}]

El pH óptimo de la alfa-amilasa de Aspergillus oryzae, es de 4.8-5.8, de Bacillus subtilis de 5.85-6.00 y de malta de 4.75-5.40. Ono, K., et al en 1958 estudiaron la influencia del pH sobre la hidrólisis de amilosa mediante amilasa bacteriana cristalizada. Ellos encontraron que mientras la constante aparente de Michaelis para la reacción permanecía constante en un valor de  $2.3 \times 10^{-3}$  moles de enlaces glucosídicos por litro para pHs de 3.6 a 8.4, la constante aparente de velocidad de la reacción disminuía

bruscamente a ambos lados del pH óptimo. Ellos suponen - que la enzima, E, o el complejo enzima sustrato, ES, es - involucrado en un tipo de equilibrio postulado por Waley, S. G. (1953) y por Laider, K. J. (1955) en el cual sólo - es enzimáticamente activa la especie EHS. El equilibrio se representa por:



Para los grupos ionizables A y B se obtuvieron - los siguientes valores:  $\text{pK}_A = 4.22$ ,  $\Delta H_A = 2.0 \text{ kcal/mol}$ ; -  $\text{pK}_B = 7.55$ ,  $\Delta H_B = 4.0 \text{ kcal/mol}$ . Las constantes de ioniza- - ción no variaron ni con la concentración del sustrato ni con la temperatura. Sobre la base de estos resultados se postula que los grupos involucrados son un carboxilo para el caso de A y un imino de histidina para B. Sin embargo, a fin de determinar qué grupos son los que participan en la disociación, es necesario mayores estudios que comple- - menten las determinaciones señaladas, y poder identificar las "constantes de disociación" cinéticamente determina- - das por las constantes de disociación de grupos en el sitio activo (Fischer, E.H., y Stein, E.A. 1960).

Los datos reportados respecto a que la formación del complejo enzima-sustrato en la reacción catalizada -

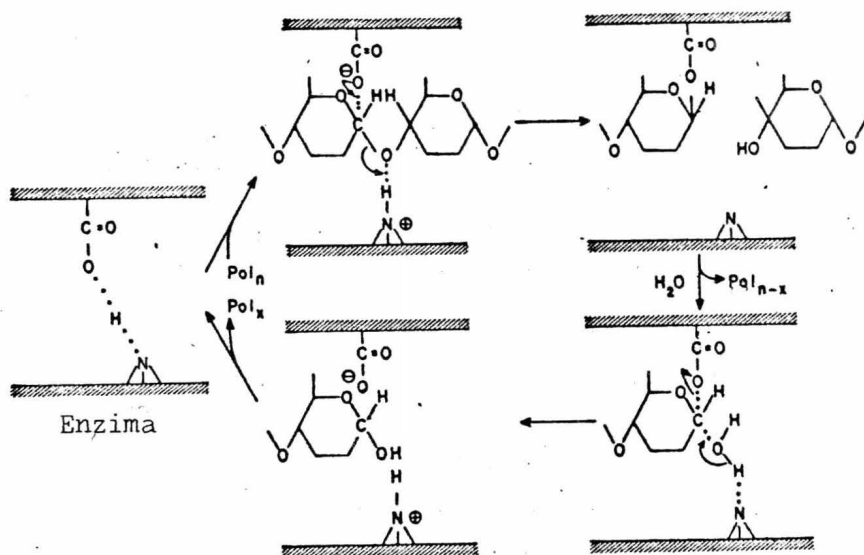
por amilasa, no es afectada por grandes variaciones en el pH, implican que ese parámetro afecta primariamente la segunda etapa de una reacción del tipo de Michaelis-Menten, que es en el que realmente se hidroliza el enlace glucosídico.

Los datos de Myrbäck (1962) y de Ono, et al (1958) para el pH óptimo de la reacción son consistentes con la opinión de que un grupo carboxilo de pK 4-5, y un grupo amino o imino de pK 7-8 son directamente involucrados en el proceso catalítico. Sobre la base de estudios químicos se piensa que en el proceso participa un grupo imino primario. La hidrólisis de almidón o glucógeno con amilasa en  $H_2O^{18}$  indican que la escisión de los enlaces glucosídicos del polisacárido es en  $C_1$ -oxígeno (Fischer, E.H., y Stein, E.A. 1960). Larner, J., y Mayer, F.C. (1958) han propuesto que en la reacción el sustrato se orienta primero sobre la superficie de la enzima. Después de protonar el puente de oxígeno, para formar un ión oxonio, se rompe el enlace glucosídico sobre el lado del carbono  $C_1$ , dejando un ión carbonio como intermediario. Durante la solvólisis, la cual completa esta reacción  $Sn_1$ , las restricciones estéricas impuestas por la superficie de la enzima sobre los residuos reductores potenciales determinan la conformación del anillo, y, finalmente, la configuración del grupo reductor.

Otro mecanismo propuesto para la acción de alfa-amilasa es el de Koshland, Jr., D.E. (1958), el cual postula un mecanismo de doble desplazamiento el que se lleva a cabo sin un cambio en la configuración óptica del átomo anomérico de carbono. Como se muestra en el diagrama del mecanismo propuesto por Koshland, hay un grupo carboxilo y un grupo nitrogenado en el sitio activo. Hay cierta incertidumbre acerca de la naturaleza del grupo nitrogenado. El pK de 6.5-8.0 podría indicar



un grupo imidazol o un grupo amino. Cuando menos, para alfa-amilasa de porcino, los efectos de fotooxidación y del ión cloruro sobre la actividad, así como el calor de ionización (4.0 kcal/mol) favorecen la opinión de que se trate de un grupo imidazol (Wakim, J., Robinson, M., y Tho--ma, J. 1969). El sustrato forma un complejo de adsorción con la enzima. En este mecanismo propuesto el ión carbonilo funciona como un nucleófilo que actúa sobre la posición  $C_1$  del sustrato, ataque que es favorecido por la -protonación del enlace mediante el ácido (ión imidazolio). Como resultado se forma un intermediario glucosil-enzima con enlaces covalentes. En la reacción de desglucosila--ción, el grupo imidazol sin protonar funciona como una base para combinar un protón del agua y liberar un  $OH^-$  el -cual reacciona en la posición  $C_1$  del complejo glucosil--enzima (Whitaker, J.R. 1972).



Una de las aplicaciones más importantes de alfa-amilasa es en suplementación de harinas destinadas a panificación. Una alta proporción de las harinas de trigo son naturalmente deficitarias en alfa-amilasa, aunque contienen cantidades apreciables de beta-amilasa. Los granos de cereales no germinados contienen fundamentalmente beta-amilasa, mientras que los granos germinados contienen además alfa-amilasa. Tradicionalmente las harinas pobres en actividad amilolítica han sido suplementadas con harina de malta. La cantidad de malta a ser adicionada depende de su propia actividad enzimática así como de la calidad de la harina a ser enriquecida. La suplementación de harinas debe ser realizada con precaución ya que un exceso puede conducir a la obtención de un pan cuya masa sea húmeda, pegajosa y poco elástica como resultado de una excesiva formación de dextrinas. Además, debe tenerse presente que ciertas harinas suplementadas con maltas conteniendo cantidades altas de proteasas pueden modificar las características del glúten disminuyendo su calidad como harina panificable. En esos casos es recomendable el uso de preparados enzimáticos de origen fúngico de bajo contenido en enzimas proteolíticas. Según Hircherberg (1957) el uso de alfa-amilasa fúngica en harinas diastásicamente deficientes confiere una serie de ventajas como: Produce una masa más fácilmente trabajable, mejora la absorción de agua, mejora la estabilidad de la masa, la textura y la porosidad, mejora también el color de la costra del pan, confiriéndole a su vez un alto grado de digestibilidad, y finalmente alarga la vida del pan (Mazza, L. A. y Balatti, A.P. 1970).

Entre otras aplicaciones de alfa-amilasa pueden mencionarse las siguientes:

- a) Elaboración de alimentos con un alto contenido en cereales, para consumo infantil (Windish, W.W., y Mhatre,

M. S. 1965). [Convierten el almidón en dextrina y azúcar e incrementan la absorción de agua.]

- [b) Clarificación de jugos, por la eliminación del almidón.
- c) Preparación de jarabes de chocolate. Licuefacción de los almidones para que los jarabes puedan ser más fácilmente manejables.
- d) Fabricación de cerveza. Ya sea convirtiendo almidón en maltosa consumida en la fermentación o para eliminar turbidez producida por almidón.
- e) Fabricación de productos farmacéuticos de uso como coadyuvantes digestivos.
- f) Jarabes y azúcares. Conversión de almidones a dextrinas de bajo peso molecular (jarabe de maíz).
- g) Vegetales. Hidrólisis de almidón. En ablandamiento de chícharos.]

Las importaciones anuales de amilasa, consignadas en el "Anuario Estadístico de Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos" (Dirección General de Estadística. Secretaría de Industria y Comercio. México), incluye las siguientes fracciones arancelarias:

Partida: 29.40.- Enzimas.

Subpartida: A.- Enzimas.

Fracción: 29.40. A.004. Amilasa, excepto lo comprendido en la fracción 29.40.A.016.

Fracción: 29.40.A.012. Diastasa de Aspergillus oryzae.

Fracción: 29.40.A.016. Amilasa bacteriana.

Fracción: 29.40.A.025. Diastasa de malta.

Fracción: 29.40.A.026. Amilasa pancreática.

El comportamiento observado en las importaciones anuales de diastasa de Aspergillus oryzae de 1968 a 1974

ESTO NO

se muestra en el cuadro 7 y gráfica 1. El volumen de importación en unidades de kg legal ha experimentado un índice de crecimiento del 248% y un incremento medio anual acumulado del 15%. El valor en pesos para la importación total de 1974 fué de 4'900,084 de pesos. Este valor incluye el valor de compra de la mercancía en el lugar de procedencia, fletes, seguros y otros gastos hasta llegar la mercancía hasta la frontera mexicana. Esta manera de valorar las mercancías importadas se denomina CIF.

A los países que en mayor porcentaje y de manera constante se les ha comprado diastasa fúngica son los Estados Unidos de Norteamérica y Suiza. Otros países con una participación relativa baja, pero que también han participado como proveedores son Dinamarca, Japón e Italia.

La tendencia experimentada en las importaciones - anuales de amilasa bacteriana, para el mismo período de estudio se muestra en el cuadro 8 y gráfica 2. El volúmen de importación en unidades de kg legal, ha experimentado un índice de crecimiento del 137% y un incremento medio anual acumulado de 10%. El valor en pesos de la importación total durante 1974 fué de 5'445,183, valor CIF.

Los países que han cubierto la importación son: - Estados Unidos de Norteamérica, Francia, Suiza, República Federal de Alemania, Dinamarca, Japón; y en una proporción baja y no constante Países Bajos y Bélgica.

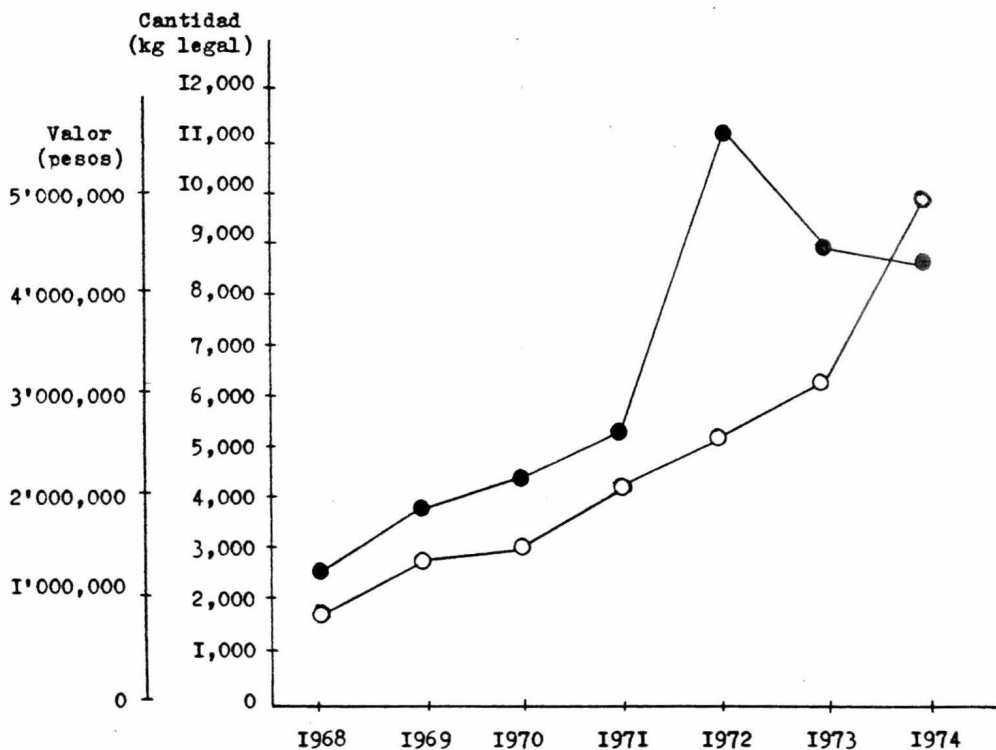
CUADRO 7. COMPORTAMIENTO OBSERVADO EN LAS IMPORTACIONES ANUALES DE DIASTASA DE Aspergillus oryzae.

AÑO	UNIDAD Y CANTIDAD (Kg legal)	VALOR EN PESOS	\$/kgl.
1968	2,514	879,391	350
1969	3,791	1'371,333	363
1970	4,430	1'511,035	342
1971	5,309	2'117,289	399
1972	11,295	2'603,377	432
1973	8,882	3'150,480	355
1974	8,708	4'900,084	564

Fuente: Dirección General de Estadística. Secretaría de Industria y Comercio. (1968 a 1974). "Anuario Estadístico de Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos". México, D.F.

ESTO NO

GRAFICA I. COMPORTAMIENTO OBSERVADO EN LAS IMPORTACIONES  
ANUALES DE DIASTASA DE Aspergillus oryzae.



● Cantidad, en kg legal.

○ Valor, en pesos.

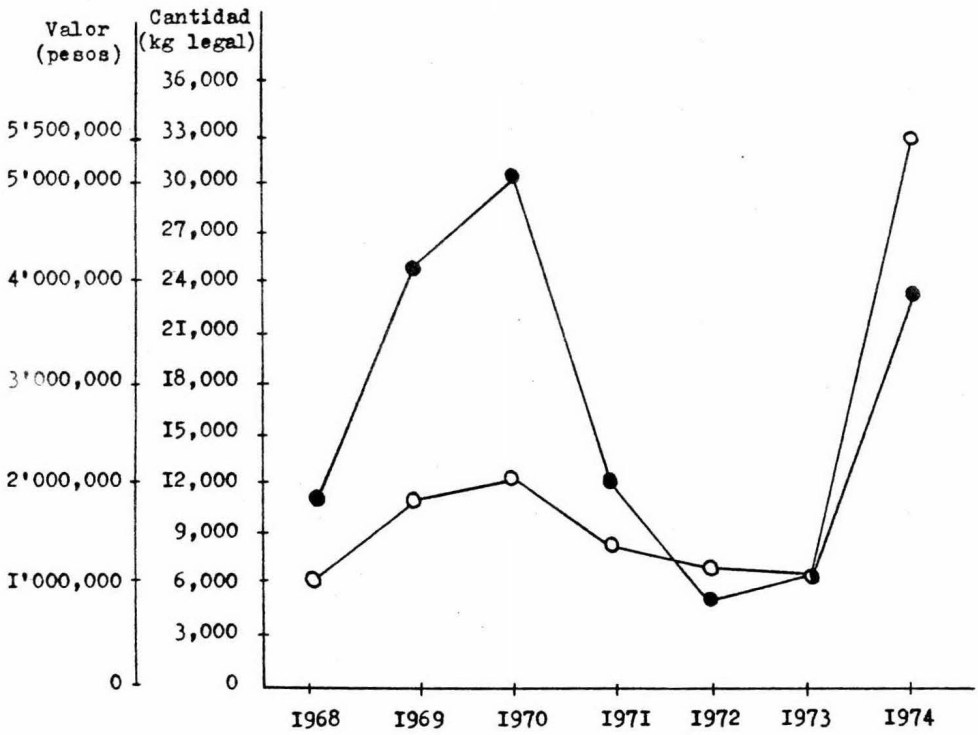
e 570 00

CUADRO 8. COMPORTAMIENTO OBSERVADO EN LAS IMPORTACIONES ANUALES DE ALFA-AMILASA BACTERIANA.

AÑO	UNIDAD Y CANTIDAD (Kg legal)	VALOR EN PESOS	\$/kgl.
1968	11,143	1'087,900	98
1969	25,229	1'866,787	76
1970	30,355	2'101,018	69
1971	12,012	1'403,364	117
1972	5,194	1'183,112	227
1973	6,636	1'071,941	161
1974	23,319	5'445,188	207

Fuente: Dirección General de Estadística. Secretaría de Industria y Comercio. (1968 a 1974). "Anuario - Estadístico de Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos". México, D.F.

GRAFICA 2. COMPORTAMIENTO OBSERVADO EN LAS IMPORTACIONES ANUALES DE AMILASA BACTERIANA.



● Cantidad, en kg legal.  
○ Valor, en pesos.



### III. MATERIALES Y METODOS.

{ En el diagrama 1, 2 y 3 se muestran las etapas seguidas en la producción, purificación y caracterización de alfa-amilas de Aspergillus oryzae. En el diagrama 4, la caracterización de la alfa-amilasa comercial de Bacillus subtilis. }

### { MICROORGANISMO }

{ Se trabajó con una cepa de Aspergillus oryzae 12802-ATCC. }

### { MEDIO DE CULTIVO PARA LA CONSERVACION DE LA CEPA. }

{ El medio de cultivo empleado para la conservación de la cepa fué YPG-Agar (Extracto de levadura-Peptona-Glucosa-Agar), cuya composición química es la siguiente: }

Extracto de levadura .....	3.0 gramos
Peptona .....	10.0 gramos
Glucosa .....	20.0 gramos
Agar .....	30.0 gramos }

{ Disolver en 950 ml de agua destilada y ajustar el pH a 4.5 con ácido sulfúrico 2 N. El volumen se lleva a 1,000 ml y se añaden 30 gramos de agar. Se calienta hasta licuar el agar y se envasan porciones de 10.0 ml en tubos con tapón de rosca. Se esterilizaron los tubos en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Después de esterilizar los tubos, se enfrían en posición inclinada. }

### { CONSERVACION DE LA CEPA }

{ En cada uno de los tubos conteniendo 10.0 ml de medio YPG-Agar solidificado se siembra por estría una asada de la cepa estudiada. }

DIAGRAMA I. PRODUCCION DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae EN -  
CULTIVO SUMERGIDO.

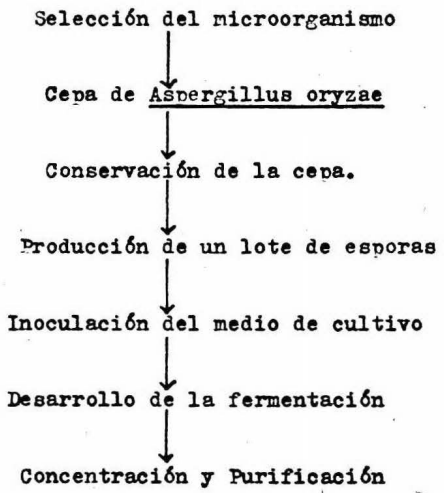


DIAGRAMA 2. CONCENTRACION Y PURIFICACION DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.

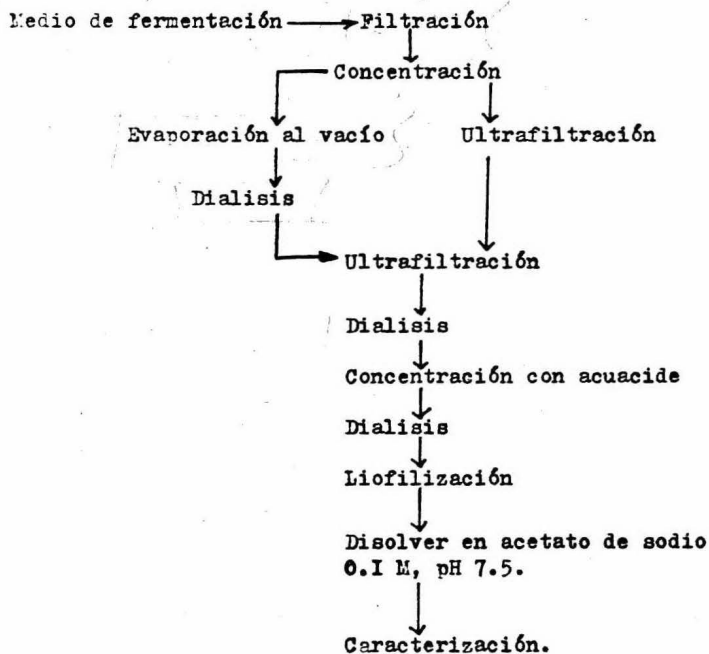


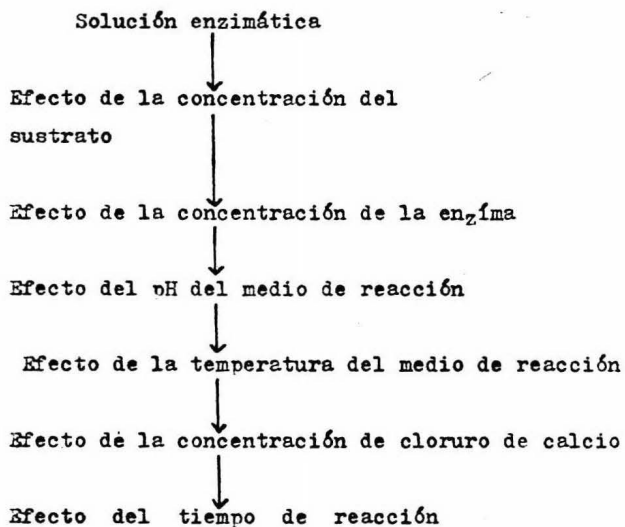
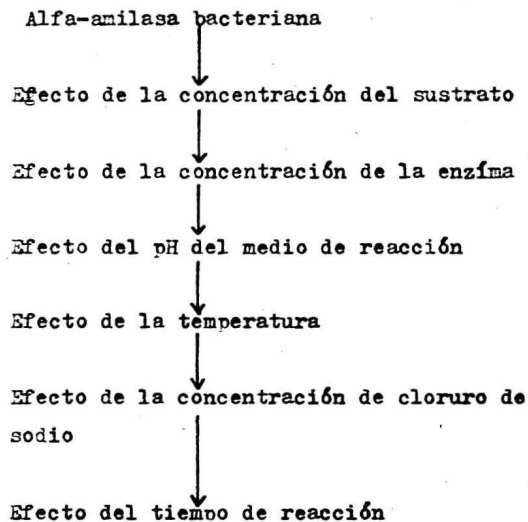
DIAGRAMA 3. CARACTERIZACION DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae

DIAGRAMA 4. CARACTERIZACION DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE  
Bacillus subtilis.



## OBTENCION DE UN LOTE DE ESPORAS.

[A partir de un tubo conteniendo esporas de la cepa estudiada y sembrada en medio YPG-Agar, se preparó una suspensión de esporas con la cual se inocularon 3 botellas de Rose con el mismo medio. Se incubaron a temperatura de 28°C durante 7 días, para la obtención de un lote de esporas que servirían para a partir de él iniciar la propagación de la cepa en cultivo sumergido.]

## MEDIO DE CULTIVO PARA LA PROPAGACION DE LA CEPA.

[El medio de cultivo para la propagación de la cepa fué el medio Czapeck con almidón como la única fuente de carbono. La composición química del medio es la siguiente:

NaNO <sub>3</sub> .....	2.0 gramos
KHPO <sub>4</sub> .....	1.0 gramos
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	0.5 gramos
KCl .....	0.5 gramos
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	0.01 gramos
Almidón soluble (Art. 1252. Merck) .....	30.0 gramos
Agua destilada .....	1000 ml
pH .....	4.5 ]

El medio se esterilizó en autoclave a 15 libras durante 15 minutos.

## DETERMINACION DEL pH.

[La determinación del pH se efectuó en un potenciómetro Metrohm Herisan, pH-meter E-512.]

## [PRODUCCION DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae EN CULTIVO SUMERGIDO.]

[Se inocularon 20 matraces Erlenmayer de 1,000 ml. conteniendo 300 ml del medio de propagación, con una suspensión de esporas de una densidad óptica de 0.8 a 620 nm. Los matraces se incubaron durante 36 a 48 horas en una agitadora rotatoria a una temperatura de 28°C. La determinación de la actividad de alfa-amilasa en el medio de propagación se hizo por el método No. 2, con objeto de seleccionar los matraces con mayor actividad.]

## [OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO CRUDO.]

[Conforme se van seleccionando los matraces con mayor actividad, se filtra el medio aplicando vacío y usando papel filtro Whatman No. 1. De esta manera se obtiene el extracto crudo.]

## [METODOS USADOS PARA CONCENTRAR EL EXTRACTO ENZIMATICO CRUDO.]

### [1. ULTRAFILTRACION ]

[Se utilizó un equipo marca AMICON modelo 402 con una membrana UM-10. Se trabajó a una temperatura de 4°C y a una presión de 48 psi, usando para ello gas nitrógeno.]

### [2. EVAPORACION AL VACIO.]

[Se utilizó un equipo rotatorio de evaporación conectado a un vacío de 14 psi. El extracto crudo se calienta hasta una temperatura de 30-35°C. La capacidad del equipo de evaporación fué de 1.0 litro.]



### 3. [ DESHIDRATACION CON ACUACIDE CALBIOCHEM. ]

[ La muestra contenida en una bolsa de diálisis se espolvoreó con el reactivo y se dejó durante 24 horas a una temperatura de 4°C. ]

### [ METODOS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA. ]

[ La determinación de la actividad de alfa-amilasa se realizó usando dos métodos, los cuales se describen a continuación: ]

#### √ 1. DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE AZUCARES REDUCTORES ]

[ Los azúcares reductores producidos por la acción de alfa-amilasa sobre el almidón, son determinados por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. ]

#### Reactivos:

##### Reactivo de DNS:

Acido 3,5-dinitrosalicílico .....	10.6 gramos
NaOH .....	19.8 gramos
Agua destilada .....	1,416 ml.

##### Disolvente:

Tartrato de sodio y potasio .....	306.0 gramos
Fenol .....	7.6 ml
Metabisulfito de sodio y potasio .....	8.3 gramos

Se titula una muestra con fenolftaleína, adicionando HCL 0.1N. Deberían de consumirse 5-6 ml de HCL. Si es necesario adicionar NaOH (2.0 gramos de NaOH=1.0 ml de HCL 0.1 N).

Procedimiento. Determinación de glucosa.

La muestra debe contener de 0.2 a 1.0 mg de glucosa por ml. Colocar un mililitro de la muestra en un tubo de ensaye y adicionar 3.0 ml de reactivo DNS. Poner a ebullición durante 5.0 minutos. Después del calentamiento se diluye la muestra con agua destilada hasta 20 ml. Se lee el % de transmitancia a 550 nm, con un blanco de agua para 100% de transmitancia.

El color se desarrolla sólo en condiciones alcalinas, de manera que cuando el medio sea ácido deberá neutralizarse.

Puesto que 3.0 ml del reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico reaccionan con 10.0 mg de glucosa, las muestras que son demasiado oscuras para poder leerse pueden diluirse hasta 1 a 10 con agua, y se obtienen resultados satisfactorios en cuanto a exactitud y precisión. Las diluciones se hacen después del calentamiento en agua a ebullición, y el resultado se multiplica por el factor de dilución. Ver diagrama 5.

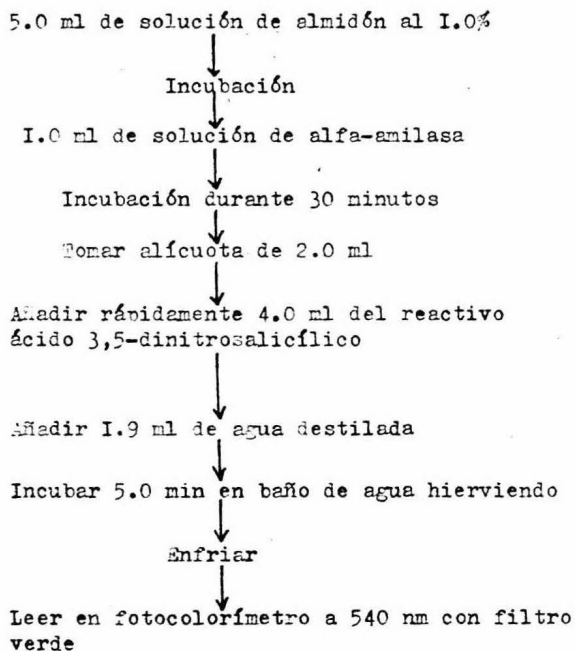
Las muestras calentadas pueden observarse un tiempo razonable después de la lectura. Las muestras antes del calentamiento se deterioran en un tiempo menor.

Esto si

## [2. DETERMINACION DEL ALMIDON RESIDUAL]

[Este método se basa en la medición de la coloración azul que produce el complejo yodo-almidón,] se dispone un tubo de ensaye al cual se le agregan 5.0 ml de una solución de almidón soluble al 1.0%. A la solución de almidón contenida en el tubo de ensaye se adicionan 1.0 ml de cloruro de calcio 0.5 M, y un volumen tal de regulador de acetatos 0.1 N, que cuando se agregue el volu-

## DIAGRAMA 5. DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE AZUCARES REDUCTORES



Para cada uno de los parámetros investigados (concentración de sustrato, concentración de enzima, pH, temperatura, concentración de sal y tiempo) los ajustes se hacen en la etapa correspondiente.

men de enzima estudiado, se tenga un volumen final de 10.0 ml. El tubo de ensayo conteniendo almidón, regulador y cloruro se agita para homogeneizar el medio de reacción. A este medio se incorpora el volumen de enzima estudiado, y se incuba según las condiciones de experimentación. Ver diagrama 6.

Del tubo anterior (tubo 1) se toma una alícuota y se recibe en un tubo (tubo 2) conteniendo 0.3 ml de HCl 1.0 N. La alícuota tomada del tubo 1 es de un volumen de 1.5 ml. Del tubo 2 se toma una alícuota de 0.2 ml y se recibe en un tubo (tubo 3) conteniendo 0.5 ml de HCl 1.0 N. Se añade 0.1 ml de lugol al tubo 3, y se lleva a 10.0 ml con agua destilada.

Se hace un blanco conteniendo 0.1 ml de lugol, 0.5 ml de HCl 1.0 N, y se lleva el volumen a 10.0 ml con agua destilada. Se prepara simultáneamente un testigo de sustrato siguiendo el método para la preparación del problema, excepto que el volumen de solución enzimática se sustituye por regulador, y no se incuba en el tubo 1.

### METODO PARA LA DETERMINACION DE PROTEINA

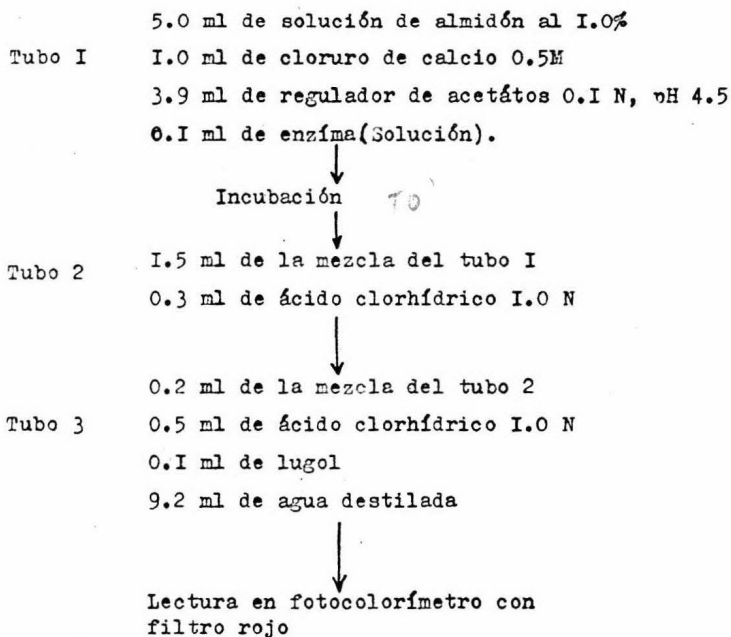
[En la determinación de proteína se utilizó el método descrito por Lowry y colaboradores](1951).

Reactivos:

- a) Carbonato de sodio 2% en NaOH 0.1 M. (7)
- b) Tartrato de sodio y potasio 1.0% en  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.5%.
- c) Mezcla de: 50 ml de (a) + 1.0 ml de (b).

La mezcla debe hacerse en múltiplos de la proporción indicada, y sirve solamente el día que se prepara.

## DIAGRAMA 6. DETERMINACION DE ALMIDON RESIDUAL.



Para cada uno de los parámetros investigados (concentración de sugtrato, concentración de enzima, pH, temperatura, concentración de sal y tiempo), los ajustes se hacen en el tubo I y/o en las condiciones de incubación.

- d) Reactivo de Fohlin diluido: 1.0 volumen de -  
reactivo de Fohlin + 2.0 volúmenes de agua.

#### Procedimiento:

Al problema conteniendo de 20 a 200 gramos de pro  
teína por ml, se le añaden 5.0 ml del reactivo -  
(c), se agita y se deja reposar 10.0 minutos. A  
continuación se adicionan 0.5 ml del reactivo -  
(d), agitando inmediatamente y dejando reposar 30  
minutos.

Simultáneamente con el problema debe hacerse una curva  
de referencia. Esta curva se hace con albúmina bo-  
vina conteniendo 400 ug/ml para límites de 40 a 200 ug.

El color se lee en espectrofotómetro a 750 nm. Se  
hace un blanco con agua destilada y reactivos.

#### DIALISIS.

Las diálisis se efectuaron contra agua de la lla-  
ve o contra regulador, según el caso.

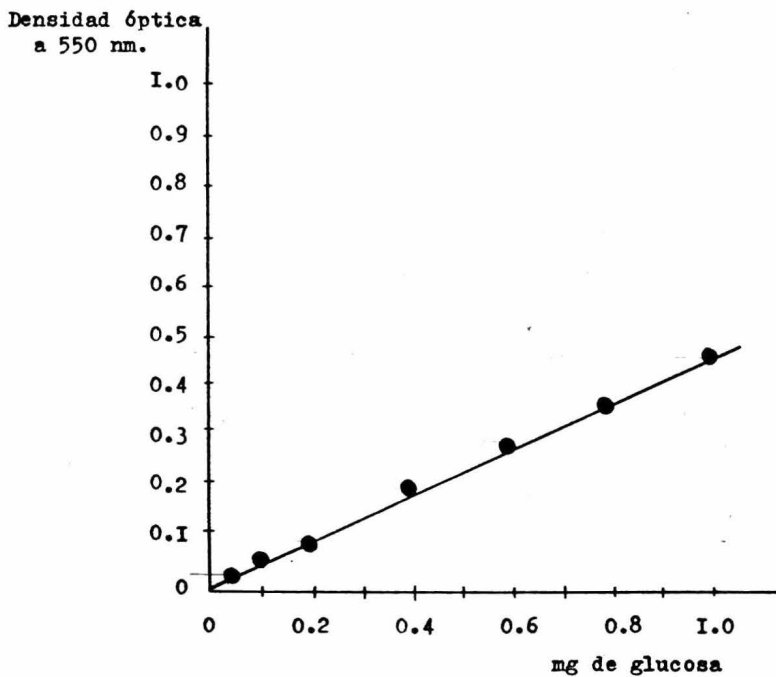
#### ALFA-AMILASA COMERCIAL.

Se trabajó con alfa-amilasa comercial de Bacillus  
subtilis, de la Compañía Sigma.

#### CURVA TIPO DE AZUCARES REDUCTORES.

En la gráfica 3 se presenta la curva tipo de azú-  
cares reductores (DNS).

GRAFICA 3. CURVA TIPO DE AZUCARES REDUCTORES(DNS).



Ecuación obtenida por mínimos cuadrados:

$$(D.O._{550nm})=0.01176+0.4545(\text{mg de glucosa})$$

ESPONDA

## CURVA TIPO DE PROTEINAS SOLUBLES.

En la gráfica 4 se presenta la curva tipo de proteínas solubles (LOWRY).

### PURIFICACION DE ALFA-AMILASA DE *Aspergillus oryzae* POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN UNA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA.

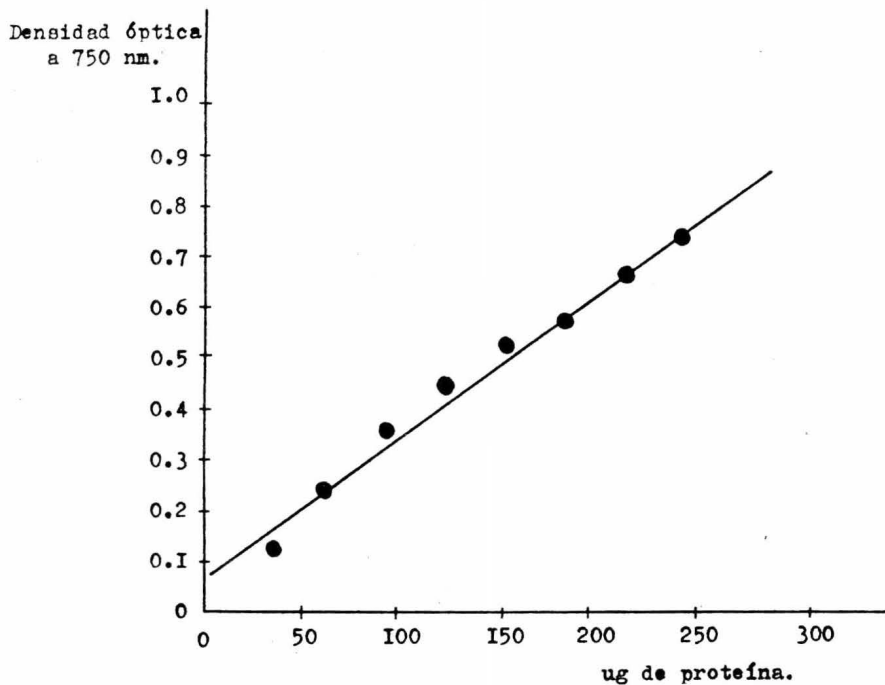
La muestra liofilizada se disolvió en 5.0 ml de una solución de acetato de sodio 0.1 M, pH 7.5. La solución resultante se pasó a través de una columna de 33 cm de altura x 5.0 cm de diámetro, empacada con DEAE-celulosa equilibrada con la solución de acetato anteriormente señalada.

La muestra se eluyó con un gradiente lineal de concentración de acetatos, además de un gradiente de pH. El gradiente se obtiene colocando 200 ml de acetato de sodio 0.1 M, pH 7.5 y 200 ml de regulador de acetatos 1.0 M, pH 6.0 en un sistema de vasos comunicantes con agitación. Se colectaron 113 fracciones de 3.0 ml cada una, y se usó un flujo de 2.0 ml por minuto.



ESTO NO

GRAFICA 4. CURVA TIPO DE PROTEINAS SOLUBLES (LOWRY).  
ALBUMINA BOVINA.



Ecuación obtenida por mínimos cuadrados:  
 $(D.O._{750nm}) = 0.07894 + 0.00278I(\text{ug de proteína})$ .

#### IV. RESULTADOS

## [PRODUCCION DE ALFA-AMILASA.]

[La máxima producción de alfa-amilasa fué a las 36 horas de desarrollo del cultivo. En este tiempo se obtuvo el extracto crudo (medio filtrado), con una actividad específica de 369.1 mg de almidón hidrolizado/mg de proteína.]

## [CONCENTRACION Y PURIFICACION.]

La concentración y purificación de alfa-amilasa se llevó a cabo conforme a lo indicado en el diagrama 2, consignándose en el cuadro 9 las determinaciones de actividad específica en las etapas del proceso.

[Para el caso en que se concentra por evaporación al vacío se observa una ligera disminución en el valor de la actividad específica; variación que no es significativa, aunque pudiera interpretarse como una desnaturalización de una fracción de la cantidad de enzima.]

El extracto concentrado por evaporación al vacío - presenta un aspecto viscoso, pegajoso y amarillento el cual desaparece al dializar el extracto contra agua de la llave. La actividad específica del extracto concentrado y dializado es de aproximadamente el doble de la del extracto sin dializar. Este resultado hace pensar que los productos eliminados en la diálisis (principalmente productos de degradación del almidón, de bajo peso molecular) ejercen un efecto de inhibición sobre la actividad de alfa-amilasa.

Para el caso de concentración del extracto crudo - mediante ultrafiltración, se observó un aumento significativo en la actividad específica de la alfa-amilasa.

La actividad específica de la muestra concentrada

20

CUADRO 9. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae EN LAS ETAPAS DE CONCENTRACION Y PURIFICACION.

E T A P A	ACTIVIDAD ESPECIFICA (mg de almidón hidrolizado /mg de proteína)
Extracto crudo	369.1
Extracto crudo concentrado por evaporación al vacío	362.8
Extracto crudo concentrado por evaporación al vacío y dializado contra agua de la llave	731.8
Extracto crudo concentrado por ultrafiltración	610.0
Mezcla	640.0
Concentración con acuacide	655.5
Concentración por liofilización	636.1
Purificación en columna de DEAE-celulosa	3,800.0

107  
y deshidratada con acúacide no experimentó un cambio sig-  
nificativo, mientras que al someterla a liofilización, -  
la actividad disminuyó ligeramente.

En la etapa final de purificación, la actividad -  
específica de la muestra concentrada aumentó de 636.1 a  
3,800. Los resultados obtenidos en el fraccionamiento -  
de la muestra a través de la columna de DEAE-celulosa se  
consignan en el cuadro 10. Para cada tubo (fracción co-  
lectada) se leyó la densidad óptica a 280 nm. El mismo\_  
resultado se muestra en la gráfica 5, en la cual se pue-  
den distinguir varias fracciones o "picos". En el cua-  
dro 11 se presentan los valores de la actividad específi-  
ca de cada una de las fracciones. Las fracciones selec-  
cionadas para hacer la caracterización fueron de la 70 a  
la 90.

La purificación de alfa-amilasa a través de todo\_  
el proceso se muestra en el cuadro 12. La purificación,  
calculada en base a la actividad específica, fué de 10.3  
veces en la fracción obtenida a la salida de la columna\_  
respecto al extracto crudo.

El % de recuperación de la alfa-amilasa fúngica a  
través de todo el proceso fué de 7.0, como se muestra en  
el cuadro 13.

La enzima comercial tiene 30.4 % de proteína, y -  
una actividad específica de 640 mg de almidón hidroliza-  
do por mg de proteína. En base a estos datos la alfa-  
amilasa fúngica a la salida de la columna es 5.93 veces\_  
más activa que la comercial. Ver cuadro 14.

CUADRO 10. DENSIDAD OPTICA A 280 nm DE LAS FRACCIONES OB  
TENIDAS A LA SALIDA DE LA COLUMNA DE DEAE-CE-  
LULOSA.

NUMERO DE TUBO	DENSIDAD OPTICA (280 nm)
1	0.210
2	0.070
3	0.055
4	0.060
5	0.050
6	0.050
7	-
8	0.050
9	0.055
10	0.050
11	0.045
12	0.060
13	0.045
14	0.050
15	0.125
16	0.060
17	0.045
18	0.045
19	0.052
20	0.043
21	0.043
22	0.040
23	0.043
24	0.045
25	0.040
26	0.040
27	0.040
28	0.040

ND

CUADRO 10..... CONTINUACION

29	0.045
30	0.049
31	0.044
32	0.045
33	0.045
34	0.050
35	0.050
36	0.058
37	0.048
38	0.045
39	0.045
40	0.051
41	0.045
42	0.085
43	0.048
44	0.050
45	0.047
46	0.048
47	0.050
48	0.052
49	0.052
50	0.056
51	0.091
52	0.074
53	-
54	0.108
55	0.120
56	0.130
57	0.130
58	0.134
59	0.135
60	0.138
61	0.115
62	0.188
63	0.205

ND

CUADRO 10..... CONTINUACION

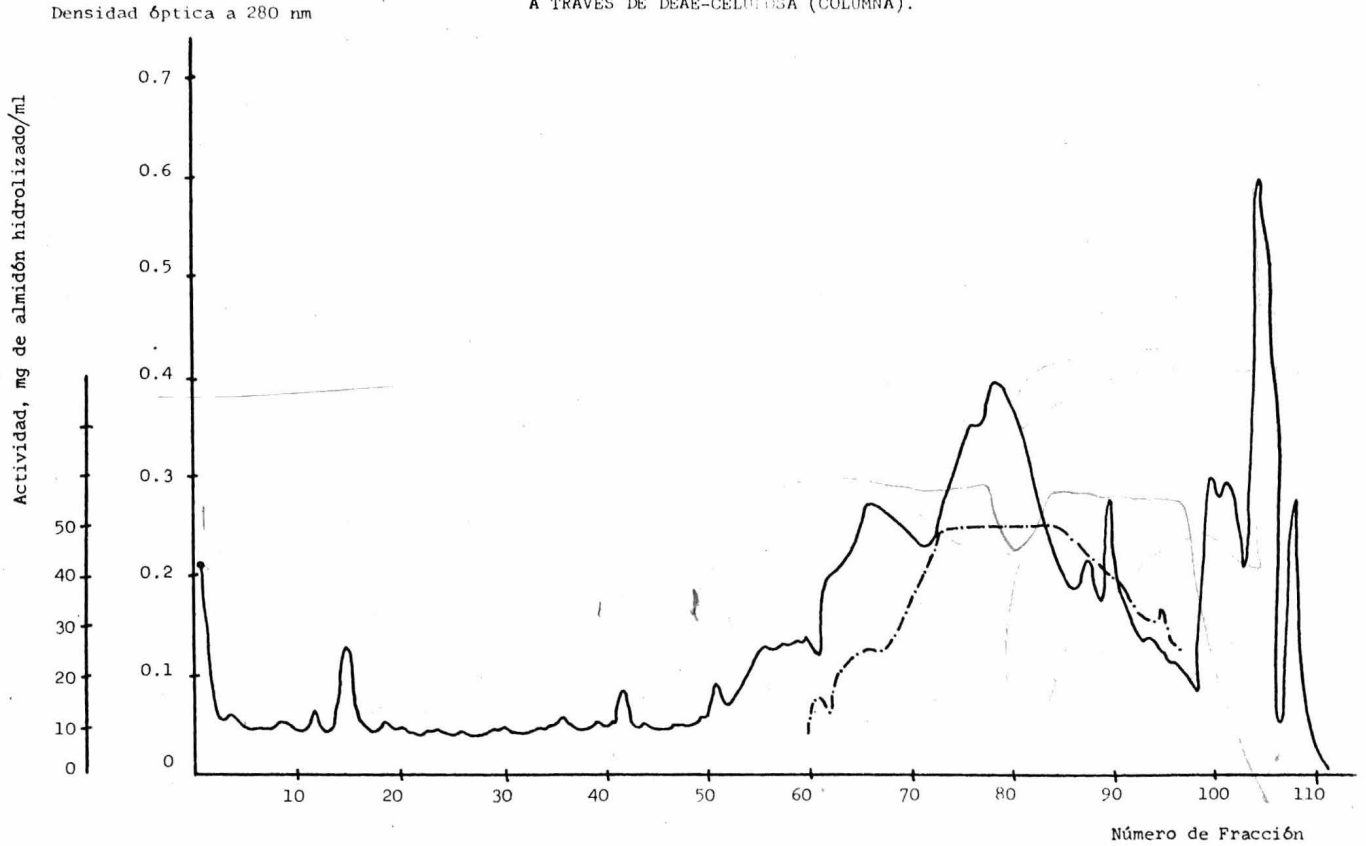
64	0.228
65	0.250
66	0.275
67	0.270
68	0.262
69	0.255
70	0.245
71	0.233
72	0.233
73	0.257
74	0.280
75	0.320
76	0.350
77	0.350
78	0.397
79	0.393
80	0.373
81	0.355
82	0.300
83	0.260
84	0.230
85	0.210
86	0.185
87	0.185
88	0.220
89	0.165
90	0.278
91	0.175
92	0.150
93	0.137
94	0.132
95	0.126
96	0.107
97	0.108



## CUADRO 10..... CONTINUACION.

98	0.095
99	0.210
100	0.302
101	0.285
102	0.295
103	0.213
104	0.240
105	0.610
106	0.045
107	0.045
108	0.280
109	0.070
110	-
111	0.058
112	0.047
113	0.045

GRAFICA 5. PURIFICACION DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae  
A TRAVES DE DEAE-CELULOSA (COLUMNA).



ca

CUADRO 11. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS FRACCIONES COLECTADAS A LA SALIDA DE LA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA.

---

FRACCION No.	ACTIVIDAD ESPECIFICA (mg de almidón hidrolizado/ml)
60	7.98
61	15.30
62	14.79
63	20.47
64	22.74
65	25.02
66	25.13
67	24.12
68	26.94
69	29.65
70	34.17
71	38.25
72	44.80
73	49.55
74	49.55
75	50.00
76	50.00
77	50.00
78	50.00
79	50.00
80	50.00
81	50.00
82	50.00
83	50.00
84	50.00
85	50.00

---

## CUADRO 11..... CONTINUACION.

86	47.74
87	45.71
88	43.15
89	41.60
90	-
91	35.47
92	30.69
93	34.10
94	30.47
95	34.10
96	26.15
97	29.56
98	17.06
99	-
100	-

CUADRO 12. PURIFICACION DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus - oryzae.

ETAPA DE LA PURIFICACION	INDICE DE PURIFICACION (En base a actividad es- pecífica)
Extracto crudo	1.00
Extracto concentrado por evapora- ción al vacío	0.98
Extracto concentrado por evapora- ción al vacío y dializado contra_ agua	1.98
Extracto crudo concentrado por ul- trafiltración	1.40
Mezcla	1.63
Concentración con acuacide	1.77
Liofilización	1.72
Cromatografía de intercambio ióni- co en columna de DEAE-celulosa	10.30

CUADRO 13. % DE RECUPERACION DURANTE LA CONCENTRACION Y PURIFICACION DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus - oryzae.

ETAPA	VOLUMEN TOTAL (ml)	PROTEINA TOTAL (mg)	ALMIDON HIDROLIZADO	% DE RECUPERACION
Extracto crudo	5,000	340	125,500	100
Fracción a la salida de la columna - de DEAE-celulosa	304	2.4	9,120	7

CUADRO 14. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ALFA-AMILASA BACTERIANA Y FUNGICA.

ENZIMA	% DE PROTEINA	ACTIVIDAD ESPECIFICA (mg de almidón hidrolizado/ml)
Comercial (bacteriana)	30.40	640.0
Extracto crudo (fúngica)	0.68	369.1
Enzima fúngica a la salida de la columna	$0.78 \times 10^{-3}$	3,800.0

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.

Se estudió el efecto que tienen diferentes concentraciones de sustrato sobre la actividad de alfa-amilasa. Los resultados (cuadro 15 y gráfica 6) muestran que hasta aproximadamente una concentración de 0.8% de sustrato se alcanza una saturación de la enzima, pero para concentraciones mayores ya se observan efectos de inhibición de la enzima por el sustrato.

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.

Se probó el efecto de la concentración de enzima sobre la actividad de alfa-amilasa. Para la concentración de sustrato usada, la enzima hidrolizó todo el sustrato a partir de volúmenes de 1.25 ml. Los resultados se muestran en el cuadro 16 y gráfica 7.

EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.

El estudio del efecto del pH sobre la actividad de alfa-amilasa indica que se tiene un pH óptimo para actividad máxima en los límites de 5.0 a 5.5. Los resultados se muestran en el cuadro 17 y gráfica 8.

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.

En el cuadro 18 y gráfica 9 se muestran los resultados obtenidos del efecto de la temperatura sobre la ac-



CUADRO 15. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus - Oryzae.

% de almidón en la mezcla de reacción	mg de almidón hidrolizado/ml de enzima
0.05	50.00
0.10	81.10
0.20	133.00
0.30	140.00
0.40	183.00
0.50	179.10
0.60	197.40
0.70	200.20
0.80	206.30
0.90	213.40
1.00	179.30
1.10	170.10
1.20	166.40
1.30	152.10
1.40	142.00
1.50	139.20

Concentración de enzima: 0.1 ml de solución enzimática en 10 ml de mezcla de reacción.

pH: 4.6.

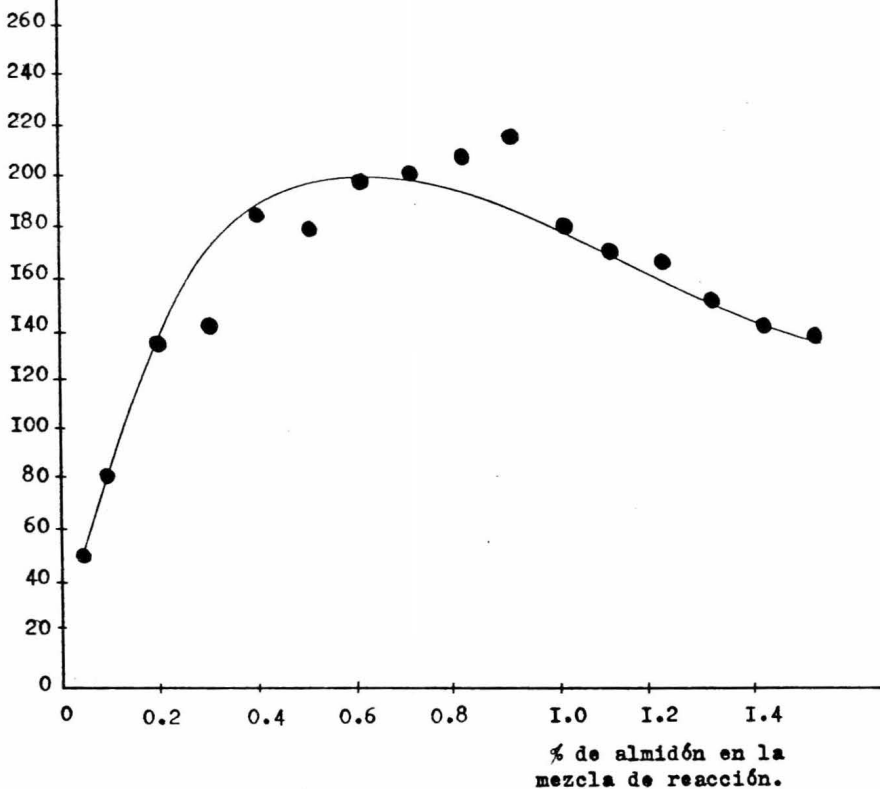
Temperatura: 30°C.

Concentración de cloruro de calcio: 0.05 M.

Tiempo: 10.0 minutos.

GRAFICA 6. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.

mg de almidón  
hidrolizado -  
por ml de en-  
zima.



CUADRO 16. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.

ml de enzima	mg de almidón hidrolizado
0.1	24.62 25.105
0.2	26.80 27.105
0.4	30.29 30.1098
0.6	31.54 31.109
0.8	35.42 35.109
1.0	48.11 48.101
1.5	48.11
2.0	48.11

Concentración de sustrato: 0.5%

pH: 4.6

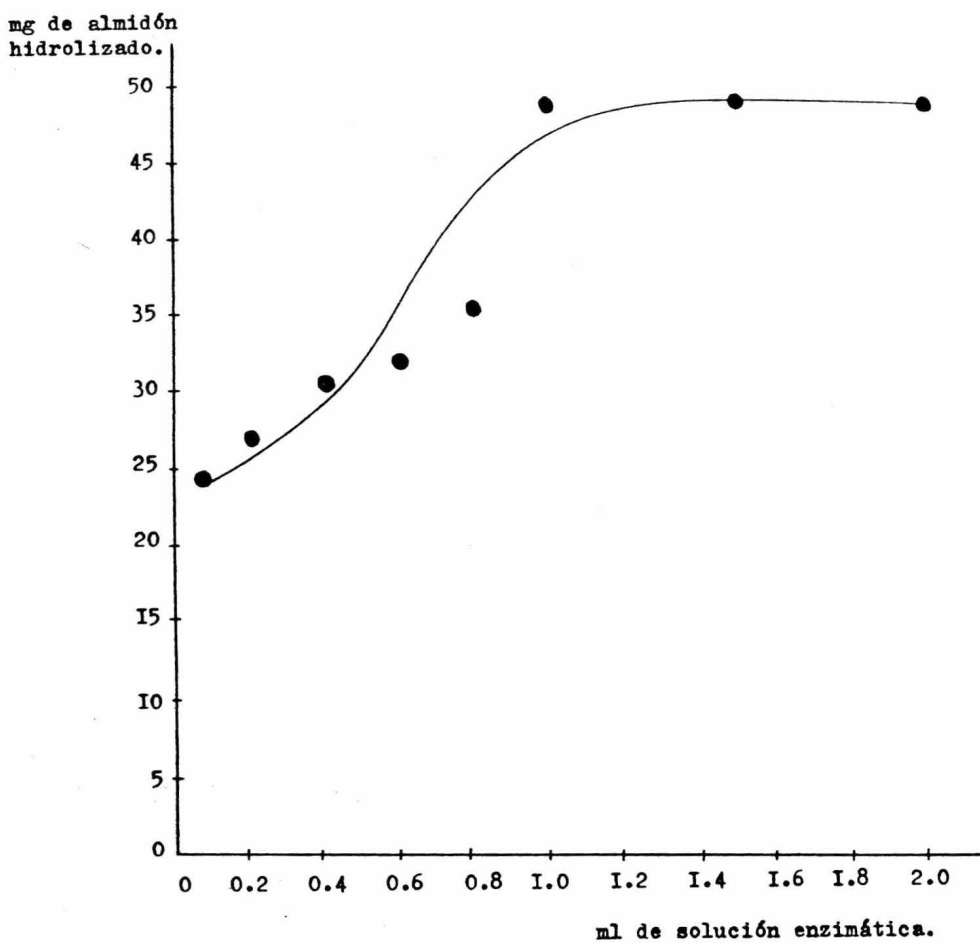
Temperatura: 30°C

Concentración de cloruro de calcio: 0.05 M

Tiempo: 10.0 minutos.



GRAFICA 7. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA  
ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.



CUADRO 17. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.

pH	mg de almidón hidrolizado/ml de enzima
2.5	57.9
3.0	63.2
3.5	68.1
4.0	113.1
4.5	179.5
5.0	188.0
5.5	190.9
6.0	160.4
6.5	45.7
7.0	65.8
7.5	10.6

Concentración de sustrato: 0.5%

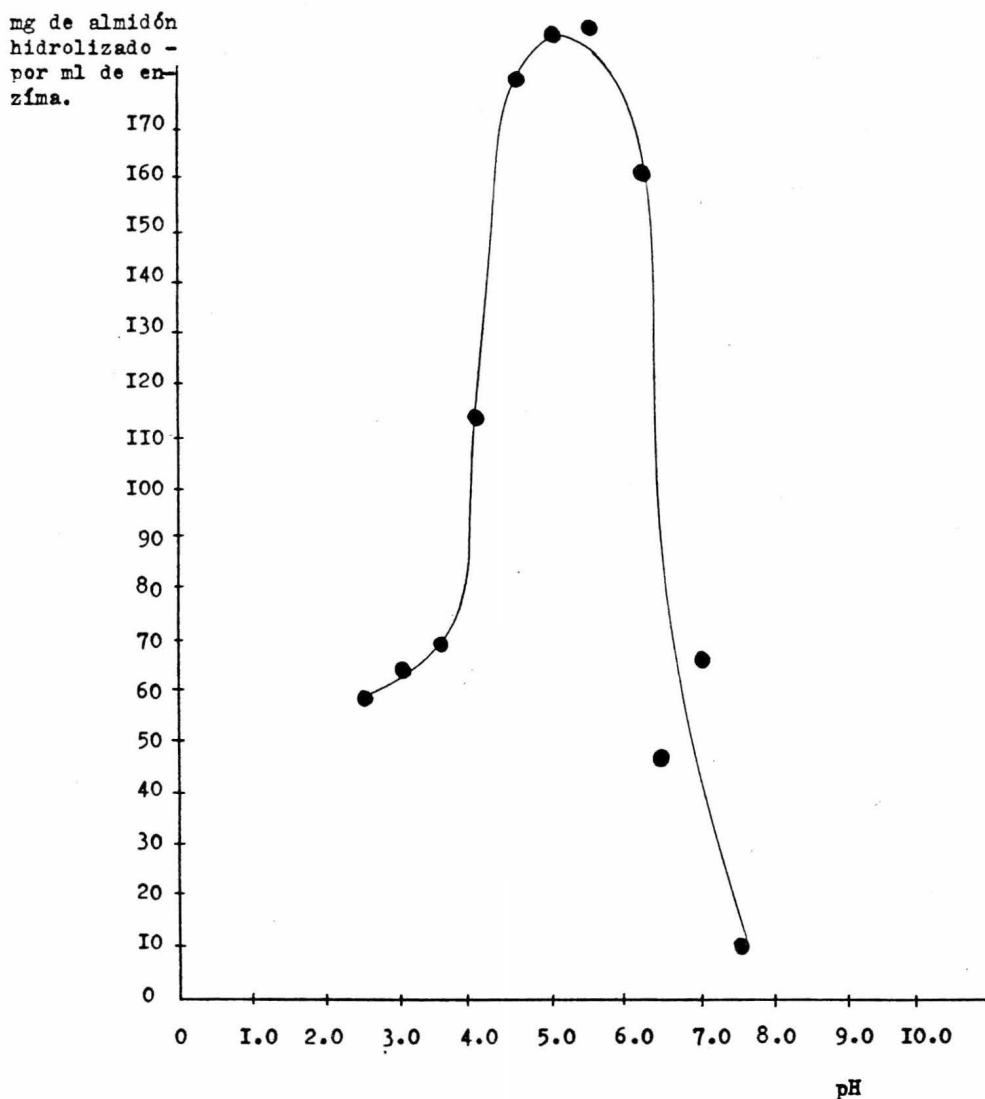
Concentración de enzima: 0.1 ml de solución enzimática en  
10 ml de mezcla de reacción.

Temperatura: 30°C

Concentración de cloruro de calcio: 0.05 M

Tiempo: 10 minutos.

GRAFICA 8. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA  
DE Aspergillus oryzae.



CUADRO 18. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.

---

Temperatura, °C	mg de almidón hidrolizado/ml de enzima
4	165.10
10	234.20
20	274.10
30	340.20
40	389.10
50	497.20
60	500.00
70	311.30
80	58.80
90	9.00

---

Concentración de sustrato: 0.5%

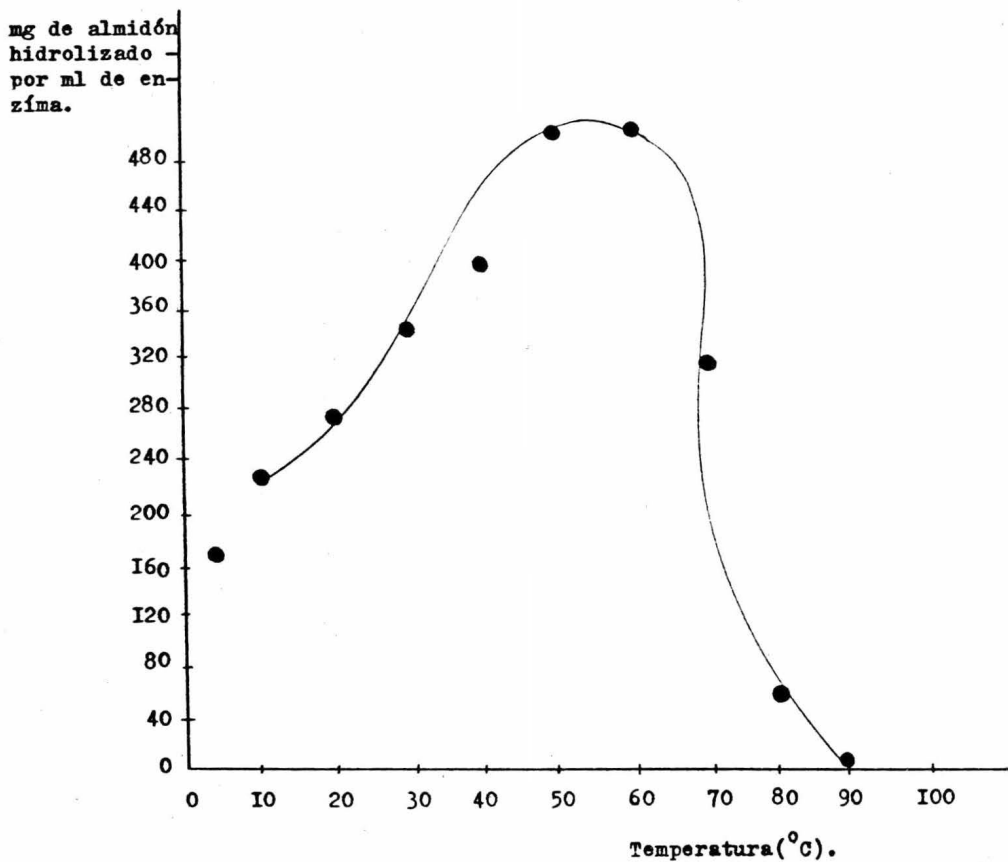
Concentración de enzima: 0.1 ml de solución enzimática en  
10 ml de mezcla de reacción.

pH: 4.5

Concentración de cloruro de calcio: 0.05 M

Tiempo: 10 minutos

GRAFICA 9. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD  
DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.





tividad de alfa-amilasa. Como puede observarse, la temperatura óptima para actividad máxima de alfa-amilasa se encuentra localizada entre los límites de 50 a 60°.

#### EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CLORURO DE CALCIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.

También se investigó el efecto de diferentes concentraciones de cloruro de calcio sobre la actividad de alfa-amilasa. Como puede verse en los resultados mostrados en el cuadro 19 y gráfica 10, para concentraciones de calcio mayores de 0.1% la actividad tiende a disminuir rápidamente.

#### EFECTO DEL TIEMPO DE REACCION SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.

Finalmente se estudió el efecto del tiempo de reacción sobre la actividad, presentándose los resultados en el cuadro 20 y gráfica 11. A los 20 minutos de incubación se alcanzó la actividad máxima para las condiciones bajo las cuales se estudió el efecto de esta variable.

#### EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus subtilis.

En el cuadro 21 y gráfica 12 se presentan los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la concentración de sustrato (almidón soluble) sobre la actividad de alfa-amilasa. Como puede observarse, se presentó un efecto inhibitorio del sustrato cuando se usaron concentraciones mayores de 1.0%. Este mismo resultado se obser

CUADRO 19. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CLORURO DE CALCIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.

Concentración molar de cloruro de calcio en la mezcla de reacción	mg de almidón hidrolizado/ml de enzima.
0.00	319.10
0.01	367.70
0.02	329.90
0.04	331.15
0.06	322.00
0.08	324.50
0.10	308.40
0.12	302.90
0.14	216.50
0.16	210.90
0.18	203.00
0.20	146.30

Concentración de sustrato: 0.5%

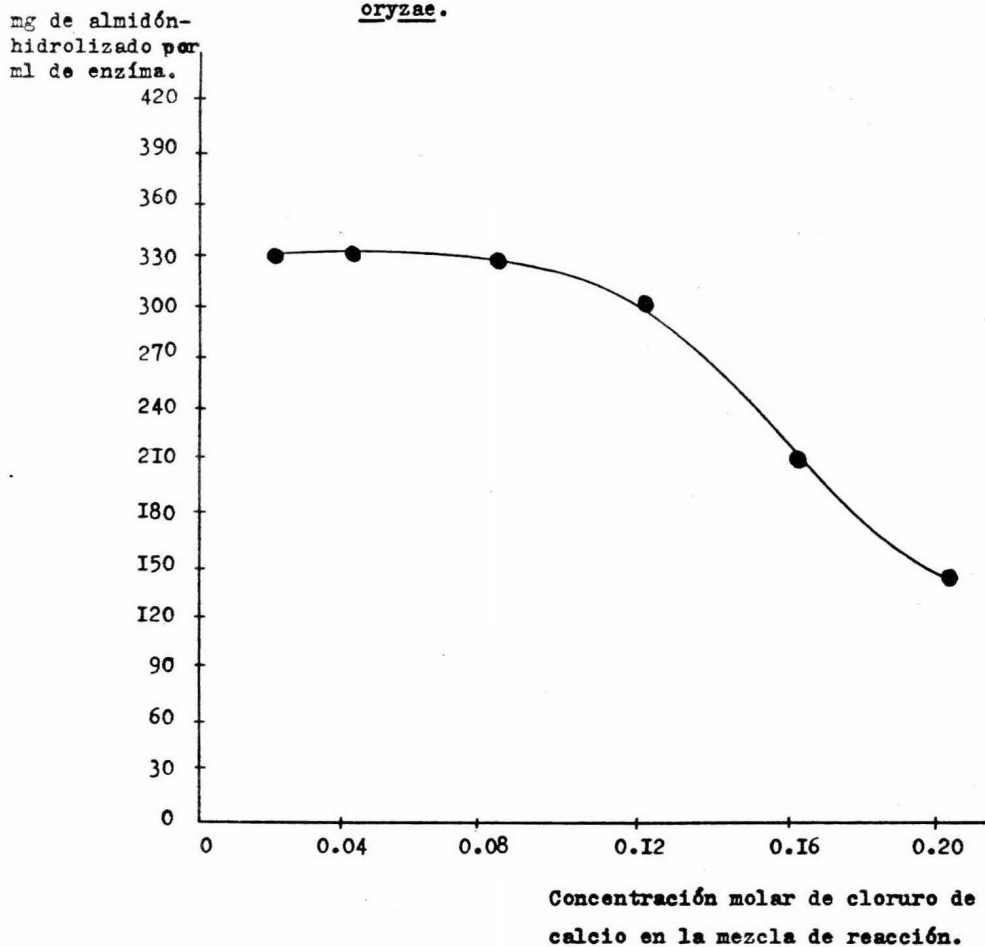
Concentración de enzima: 0.1 ml de solución enzimática en 10 ml de mezcla de reacción.

pH: 4.6

Temperatura: 30°C

Tiempo: 10 minutos.

GRAFICA IO. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CLORURO DE CALCIO—  
SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus  
oryzae.



CUADRO 20. EFECTO DEL TIEMPO DE REACCION SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae.

Tiempo, minutos	mg de almidón hidrolizado/ml de enzima
5	197.60
10	246.20
15	311.00
20	338.00
25	338.00
30	334.50

Concentración de sustrato: 0.5%

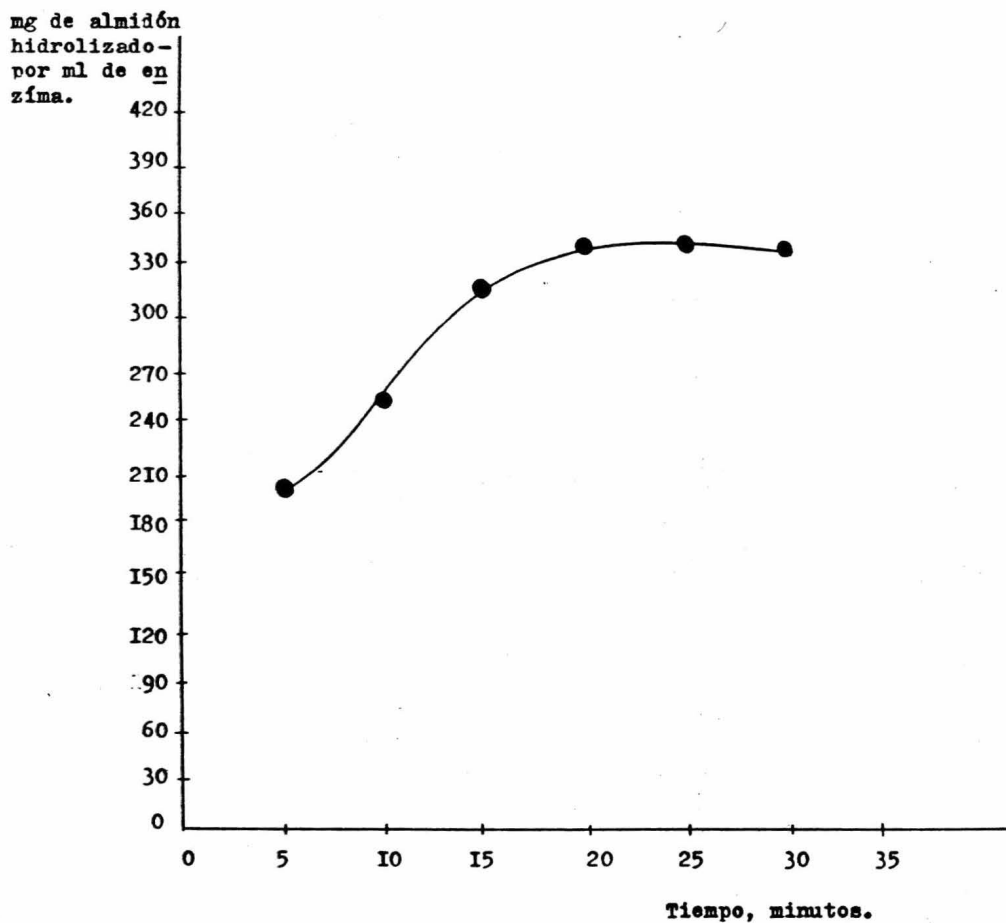
Concentración de enzima: 0.1 ml de solución enzimática en  
10 ml de mezcla de reacción.

pH:4.6

Temperatura: 30°C

Concentración de cloruro de calcio: 0.05 M.

GRAFICA II. EFECTO DEL TIEMPO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-  
AMILASA DE Aspergillus oryzae.



CUADRO 21. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus oryzae.

% de almidón en la mezcla de reacción	mg/ de glucosa/ml
0.08	0.275
0.17	0.280
0.33	0.720
0.50	0.880
0.67	0.890
0.83	1.860
1.00	1.920
1.17	2.370
1.33	2.870
1.50	1.690
1.67	1.030

Concentración de enzima:  $0.416 \times 10^{-5}$  gramos de enzima/ml

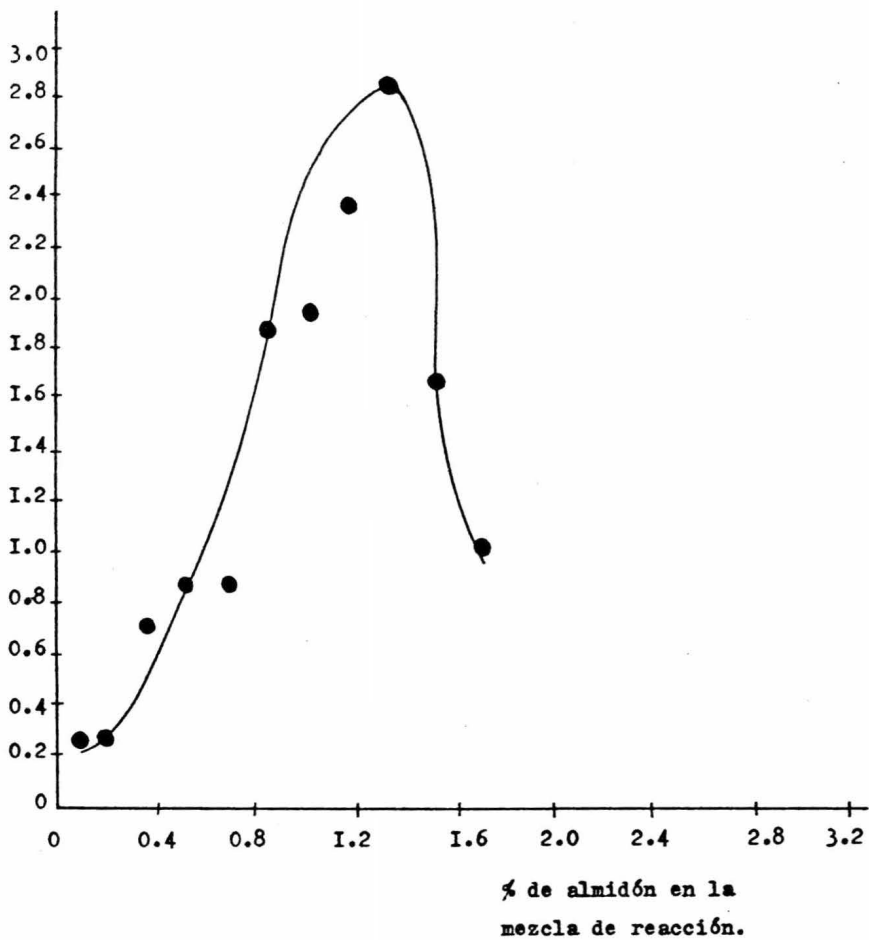
pH: 6.9

Temperatura: 30°C.

Tiempo: 30 minutos.

GRAFICA I2. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus subtilis.

mg de glucosa  
por ml



vó para el caso de alfa-amilasa de Aspergillus oryzae.

#### EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA ACTIVIDAD - DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus subtilis.

En el cuadro 22 y gráfica 13 se consignan los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la concentración de enzima sobre la actividad de alfa-amilasa. Para los niveles de enzima (concentración de enzima) experimentados se observa un aumento sostenido en la actividad, en relación a la cantidad de enzima utilizada.

#### EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMER- - CIAL DE Bacillus subtilis.

El pH óptimo para actividad máxima determinado experimentalmente se encuentra localizado entre los límites de 5.2 a 6.9. La curva de pH (perfil de pH) obtenido para esta enzima comercial es un perfil característico. Los datos se muestran en el cuadro 23 y gráfica 14.

#### EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILA SA COMERCIAL DE Bacillus subtilis.

El perfil temperatura-actividad obtenido para esta enzima comercial (gráfica 15 y cuadro 24) se observa - un óptimo de temperatura para actividad máxima localizada entre 60 y 65°C. Datos anteriormente reportados señalan una temperatura óptima mayor. Este resultado ligeramente bajo en relación a esos reportes pueden deberse a la impureza de la enzima y/o a las condiciones en que haya sido manejada desde las etapas de producción.



CUADRO 22. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus subtilis.

gramos de enzima/ml de mezcla de reac-- ción.	mg de glucosa/ml
$0.16 \times 10^{-6}$	0.00
$0.41 \times 10^{-6}$	0.04
$0.83 \times 10^{-6}$	0.20
$0.16 \times 10^{-5}$	0.34
$0.41 \times 10^{-5}$	1.03
$0.83 \times 10^{-5}$	1.48
$0.16 \times 10^{-4}$	2.78
$0.41 \times 10^{-4}$	3.64

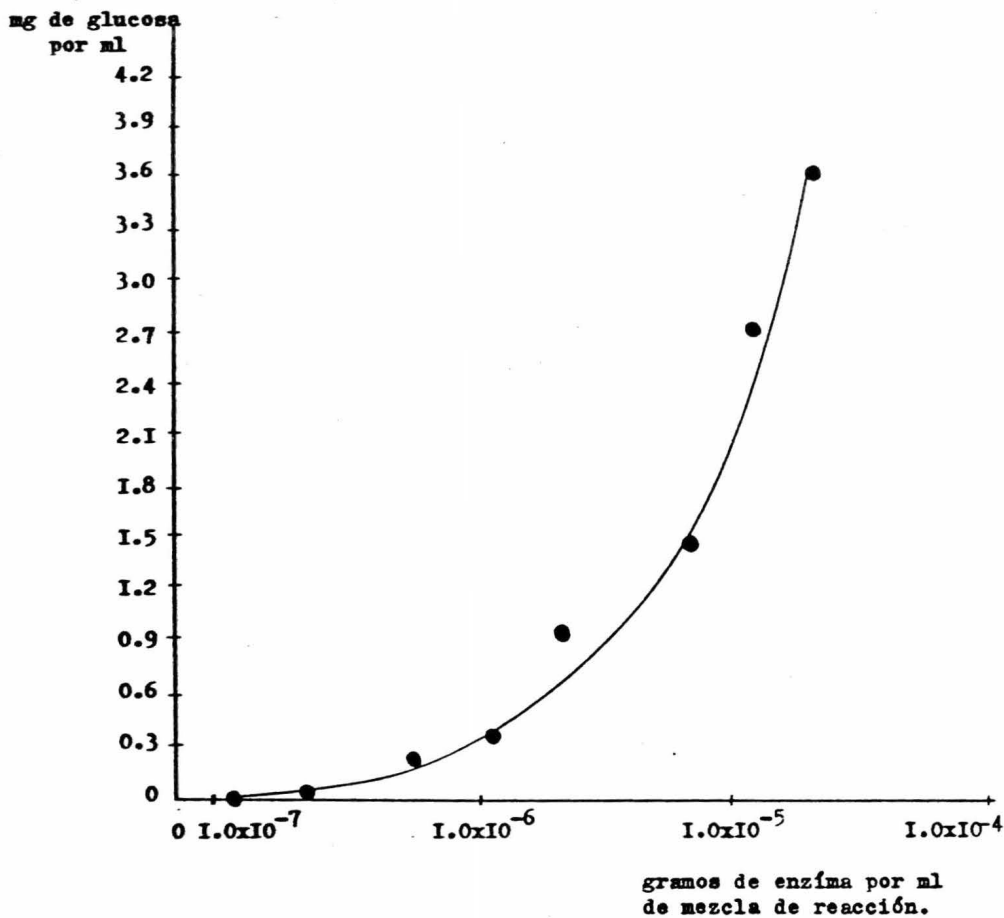
Concentración de sustrato: 0.83%

pH: 6.9

Temperatura: 30°C

Tiempo: 30 minutos.

GRAFICA 13. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA -  
ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus  
subtilis.



CUADRO 23. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus subtilis.

pH	mg de glucosa/ml
4.0	2.30
4.5	2.60
5.0	2.80
5.5	3.06
6.0	3.04
6.5	2.90
6.8	2.84
7.0	2.76
7.5	2.40
8.0	2.26
8.5	2.14

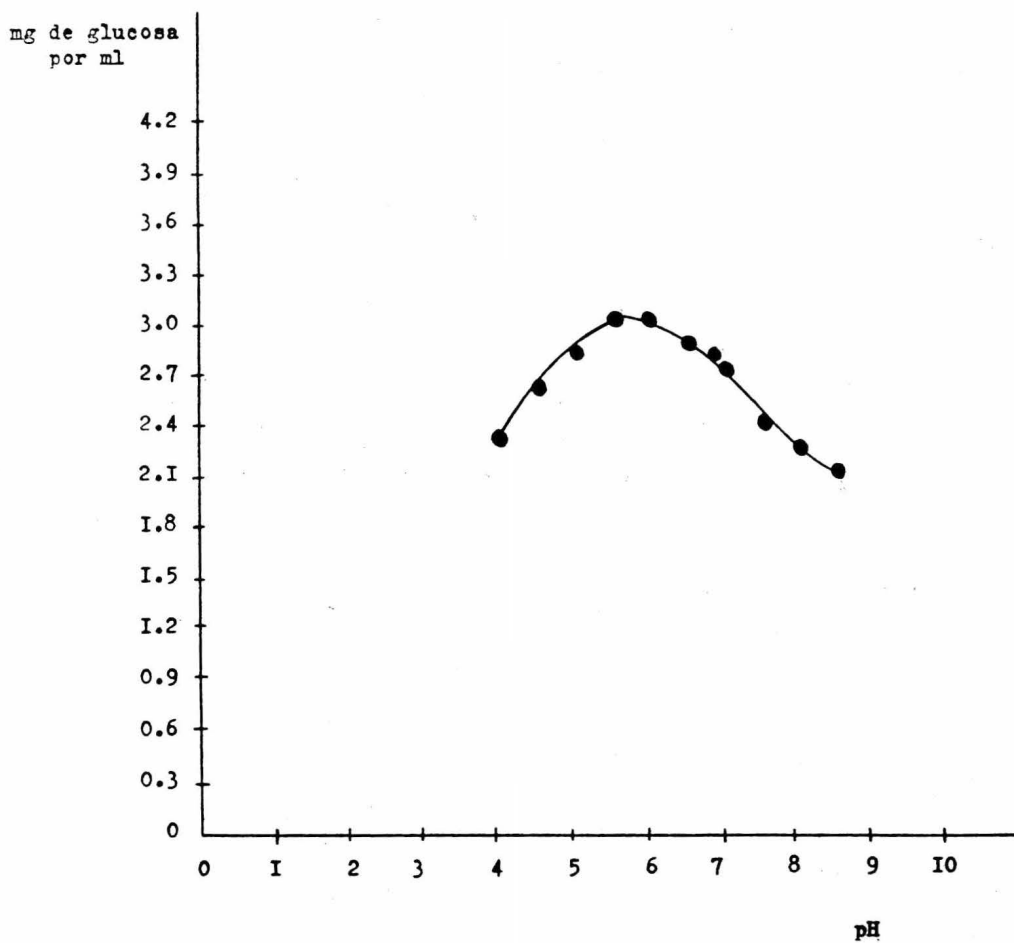
Concentración de sustrato: 0.83%

Concentración de enzima:  $0.416 \times 10^{-5}$  gramos de enzima/ml

Temperatura: 36°C.

Tiempo: 30 minutos.

GRAFICA I4. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA  
COMERCIAL DE Bacillus subtilis.



CUADRO 24. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus subtilis.

Temperatura, °C	mg de glucosa/ml
4	3.20
15	3.28
25	4.48
30	5.28
35	5.28
40	5.60
45	6.18
50	6.24
60	6.56
70	4.90
75	4.55
80	5.00
90	2.65

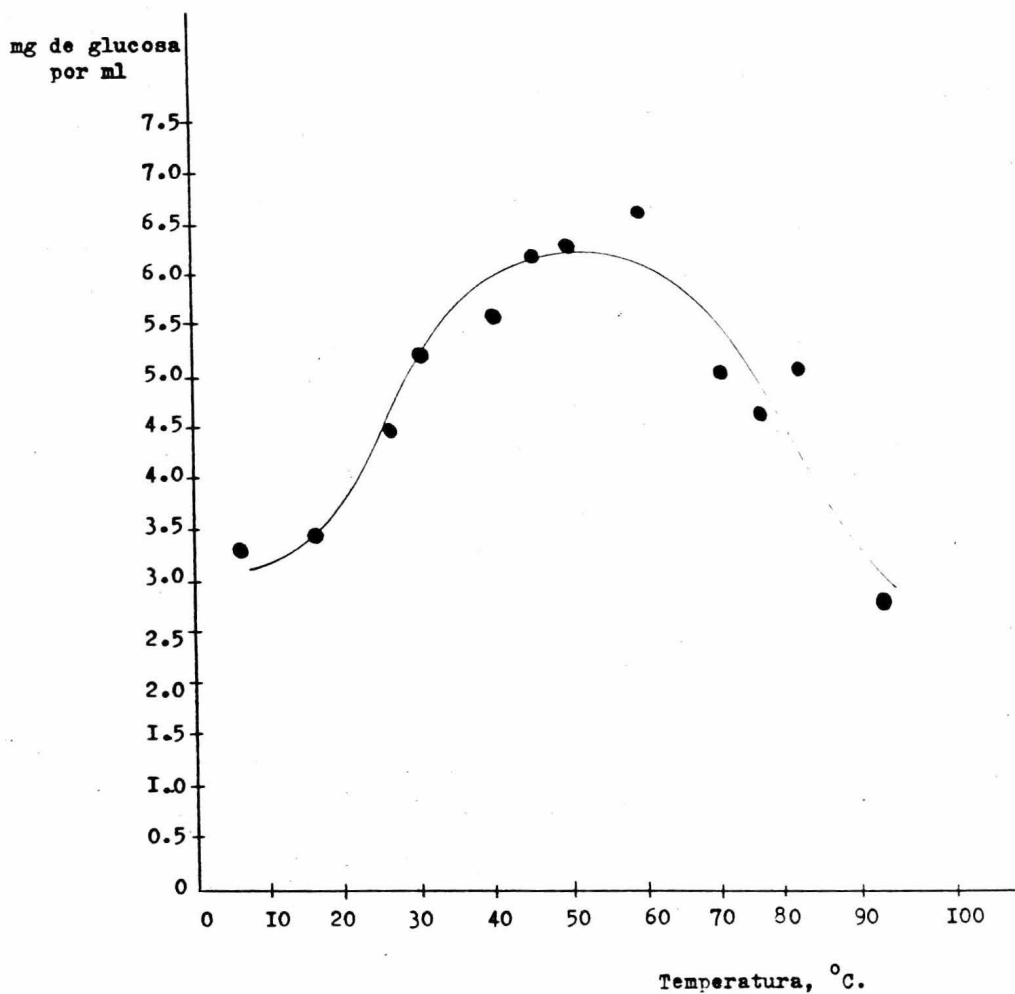
Concentración de sustrato: 0.83%.

Concentración de enzima:  $0.416 \times 10^{-5}$  gramos de enzima/ml.

pH: 6.9

Tiempo: 30 minutos.

GRAFICA 15. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE  
ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus subtilis.



EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE CLORURO DE SODIO SOBRE LA -  
ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus subtilis.

En el cuadro 25 y gráfica 16 se presentan los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la concentración de cloruro de sodio sobre la actividad de alfa-amilasa. Como puede observarse, se presenta un efecto inhibitorio para concentraciones molares mayores de 0.65.

EFEECTO DEL TIEMPO DE REACCION SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus subtilis.

Los resultados del estudio del efecto del tiempo de reacción sobre la actividad de alfa-amilasa bacteriana se muestran en el cuadro 26 y gráfica 17. A los 20 minutos se alcanzó la actividad máxima para las condiciones de trabajo de las demás variables controladas durante la experimentación.

ESTO NO

CALCULO DE LA ENERGIA DE ACTIVACION.

La energía de activación de las reacciones enzimáticamente catalizadas se calculó aplicando la ecuación de Arrhenius (ecuación 1), usando los datos experimentales.

$$\log V = \frac{E_a}{2.303 RT} + b \dots\dots (1)$$

Para la reacción de hidrólisis de almidón soluble catalizada por alfa-amilasa de Aspergillus oryzae:

$$E_a = 2,780 \text{ cal/mol (cuadro 27 y gráfica 18)}$$

CUADRO 25. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NaCl SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus subtilis.

---

Concentración molar de NaCl en la mezcla de reacción	mg de glucosa/ml
---	------------------

---

0.00000	4.56
0.00220	6.64
0.00450	6.52
0.00670	6.86
0.01000	6.82
0.01500	6.90
0.02000	6.70
0.10000	4.73
0.50000	4.83
1.00000	4.75
2.00000	4.11

---

Concentración de sustrato: 0.83%

Concentración de enzima:  $0.416 \times 10^{-5}$  gramos de enzima/ml

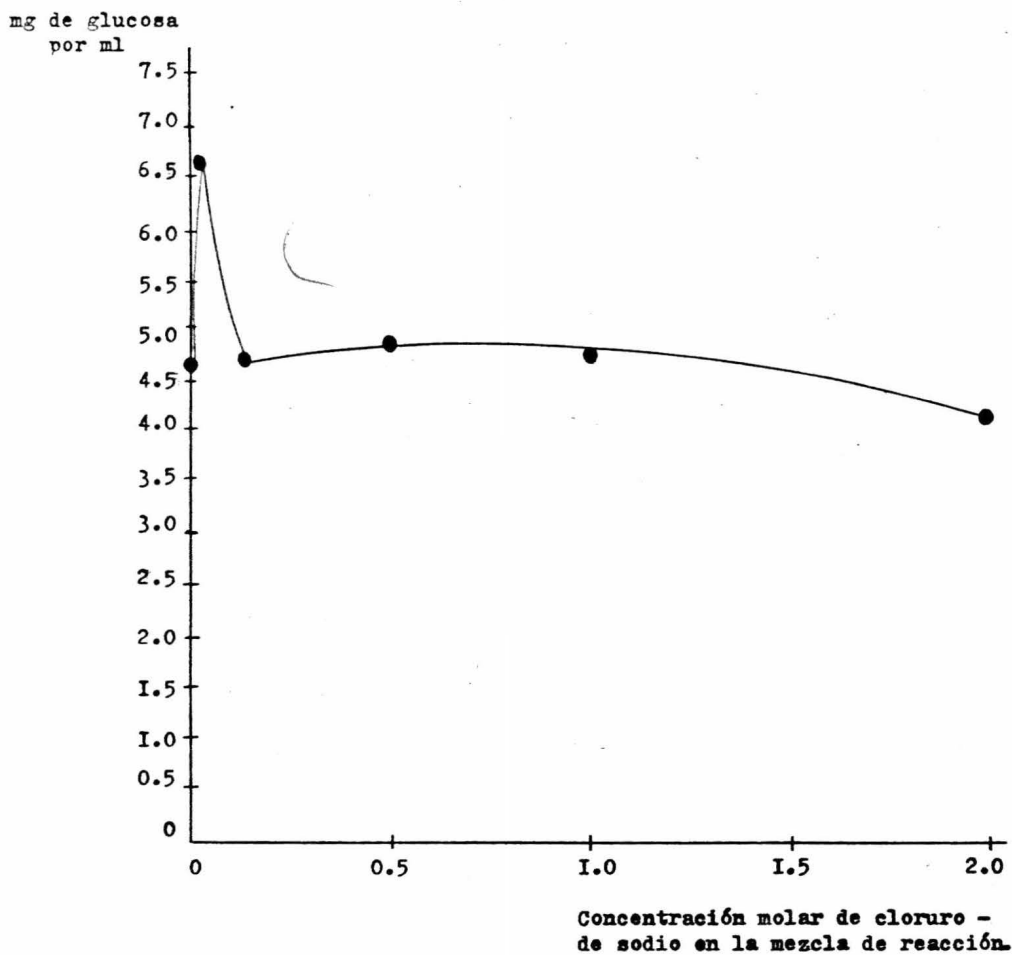
pH: 6.9

Temperatura: 30°C

Tiempo: 30 minutos.



GRAFICA 16. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CLORURO DE SODIO  
SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMERCIAL -  
DE Bacillus subtilis.



CUADRO 26. EFECTO DEL TIEMPO DE REACCION SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus subtilis.

---

Tiempo, minutos	mg de glucosa/ml
5	1.74
10	3.28
15	3.62
20	4.22
25	4.18
30	4.22

---

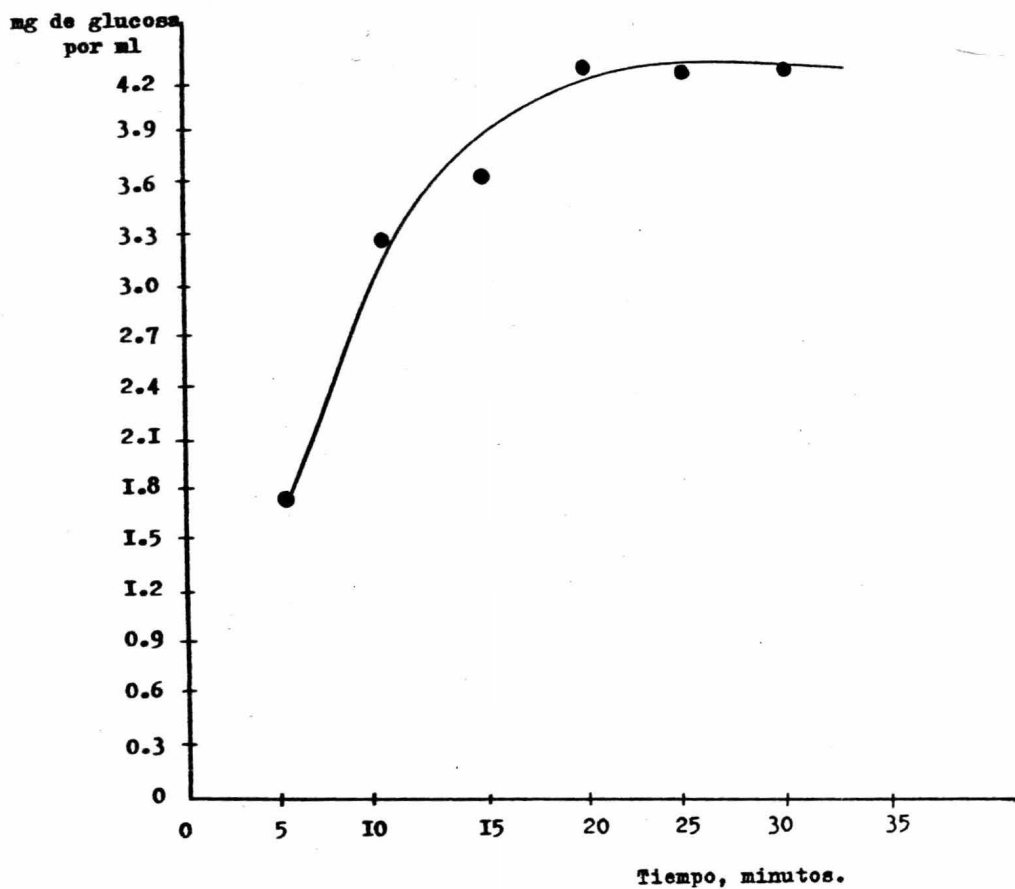
Concentración de sustrato: 0.83%

Concentración de enzima:  $0.416 \times 10^{-5}$  gramos de enzima/ml

pH: 6.9

Temperatura: 30°C.

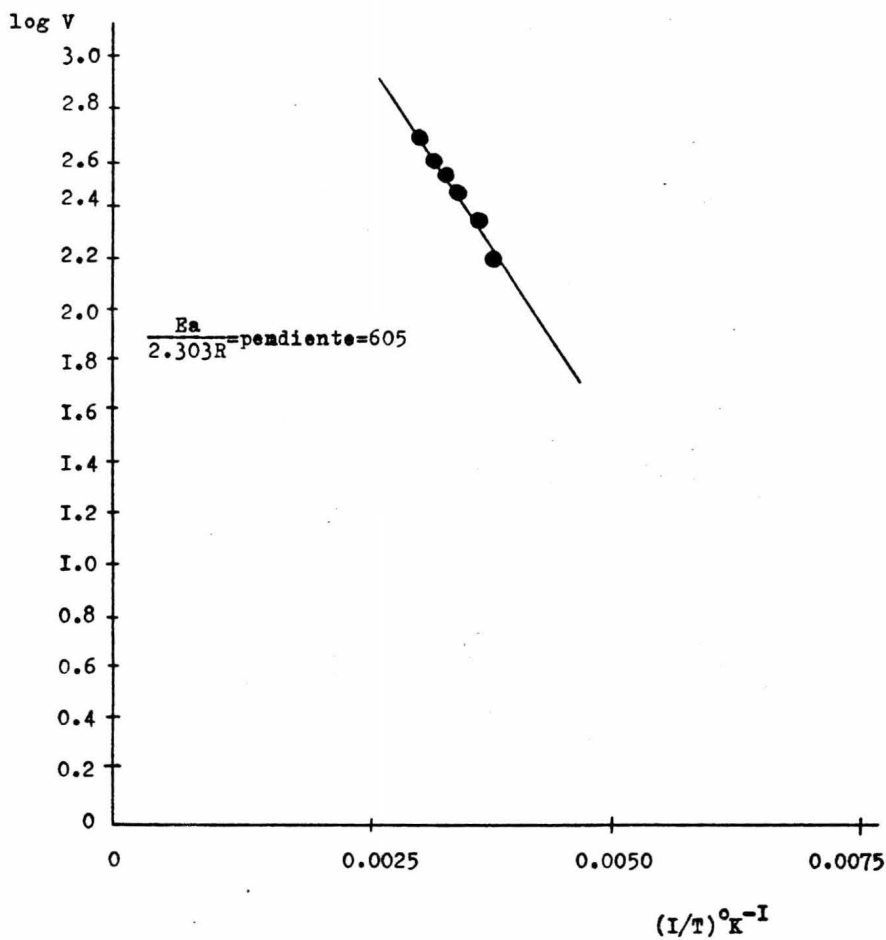
GRAFICA 17. EFECTO DEL TIEMPO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA COMERCIAL DE Bacillus subtilis.



CUADRO 27. DATOS EXPERIMENTALES PARA EL CALCULO DE LA -  
ENERGIA DE ACTIVACION DE LA REACCION ENZIMATI  
CAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA FUNGICA:

T°C	T°K	V mg de almidón <u>hidrolizado</u> ml de enzima	(I/T)°K <sup>-1</sup>	log V
4	277	165.10	0.00361	2.2175
10	283	234.20	0.00353	2.3692
20	293	274.10	0.00341	2.4378
30	303	340.20	0.00330	2.5317
40	313	389.10	0.00319	2.5900
50	323	497.20	0.00309	2.6965

GRAFICA 18. CALCULO DE LA ENERGIA DE ACTIVACION DE LA REACCION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR - ALFA-AMILASA FUNGICA.



Para la reacción de hidrólisis de almidón soluble catalizada por alfa-amilasa comercial de Bacillus subtilis:

$$E_a = 1,191 \text{ cal/mol (cuadro 28 y gráfica 19)}$$

CALCULO DE  $Q_{10}$ .

La función  $Q_{10}$  se calculó mediante la ecuación 11, mostrándose en los cuadros 29 (amilasa fúngica) y 30 (amilasa bacteriana) los valores para cada intervalo de temperatura.

$$Q_{10} = \frac{V_{t+10^\circ}}{V_t} \dots\dots\dots (11)$$

CALCULO DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN.

La constante de Michaelis-Menten para la reacción enzimáticamente catalizada se calculó mediante los siguientes métodos:

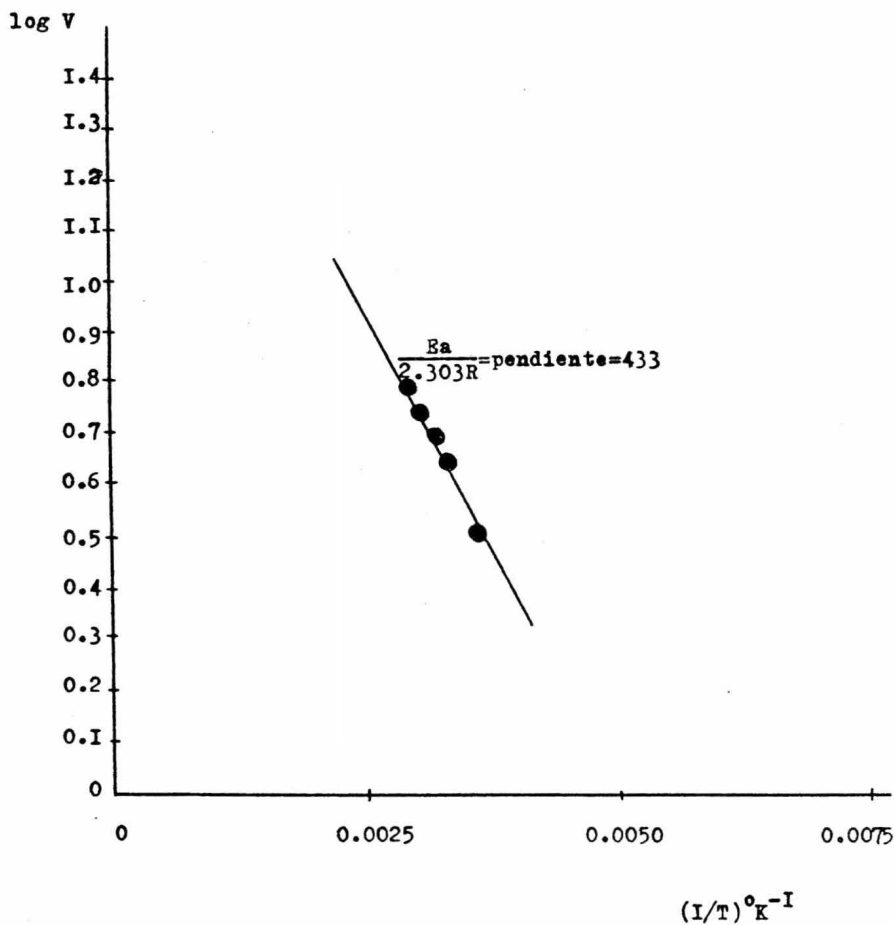
- i) Directamente usando la gráfica del efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de hidrólisis del mismo.
- ii) Lineweaver-Burk, usando mínimos cuadrados.
- iii) Augustinsson, usando mínimos cuadrados.
- iv) Eadie o Hofstee, usando mínimos cuadrados.

Simultáneamente se calculó el valor de la velocidad máxima para la reacción enzimáticamente catalizada.

CUADRO 28. DATOS EXPERIMENTALES PARA EL CALCULO DE LA -  
ENERGIA DE ACTIVACION DE LA REACCION ENZIMATI  
CAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA BACTERIA-  
NA.

T°C	T°K	V <u>mg de glucosa</u> ml	(1/T)°K <sup>-1</sup>	log V
4	277	3.20	0.0036	0.5051
15	288	2.28	0.0034	0.3579
25	298	4.48	0.0033	0.6513
30	303	5.28	0.0033	0.7226
35	308	5.28	0.0032	0.7226
40	313	5.60	0.0031	0.7428
45	318	6.18	0.0031	0.7559
50	323	6.24	0.0030	0.7952
60	333	6.56	0.0030	0.8116

GRAFICA 19. CALCULO DE LA ENERGIA DE ACTIVACION DE LA REACCION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR - ALFA-AMILASA BACTERIANA.





CUADRO 29.  $Q_{10}$  DE LA REACCION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA FUNGICA.

DIFERENCIA EN °C	$Q_{10}$
10-20	1.17
20-30	1.24
30-40	1.14
40-50	1.27
50-60	1.00
60-70	0.62
70-80	0.18
80-90	0.15

CUADRO 30.  $Q_{10}$  DE LA REACCION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA  
POR ALFA-AMILASA BACTERIANA.

DIFERENCIA EN °C	$Q_{10}$
15-25	1.96
25-35	1.17
30-40	1.06
35-45	1.17
40-50	1.11
50-60	1.05
60-70	0.74
70-80	1.02
80-90	0.53

Para la reacción catalizada por alfa-amilasa fúngica se obtuvieron los siguientes resultados:

- i) Método directo, en la gráfica concentración de sustrato-velocidad de hidrólisis:

$$K_m = 1.43 \times 10^{-1} \quad ; \quad V_{max} = 200 \text{ (gráfica 20)}$$

- ii) Lineweaver-Burk, usando mínimos cuadrados:

$$K_m = 1.43 \times 10^{-1} \quad ; \quad V_{max} = 192.0 \text{ (Cuadro 31 y gráfica 21)}$$

- iii) Augustinsson, usando mínimos cuadrados:

$$K_m = 2.33 \times 10^{-1} \quad ; \quad V_{max} = 277.0 \text{ (cuadro 32 y gráfica 22)}$$

- iv) Eadie o Hofstee, usando mínimos cuadrados:

$$K_m = 2.54 \times 10^{-1} \quad ; \quad V_{max} = 286 \text{ (cuadro 33 y gráfica 23)}$$

Para la reacción catalizada por alfa-amilasa bacteriana se obtuvieron los siguientes resultados:

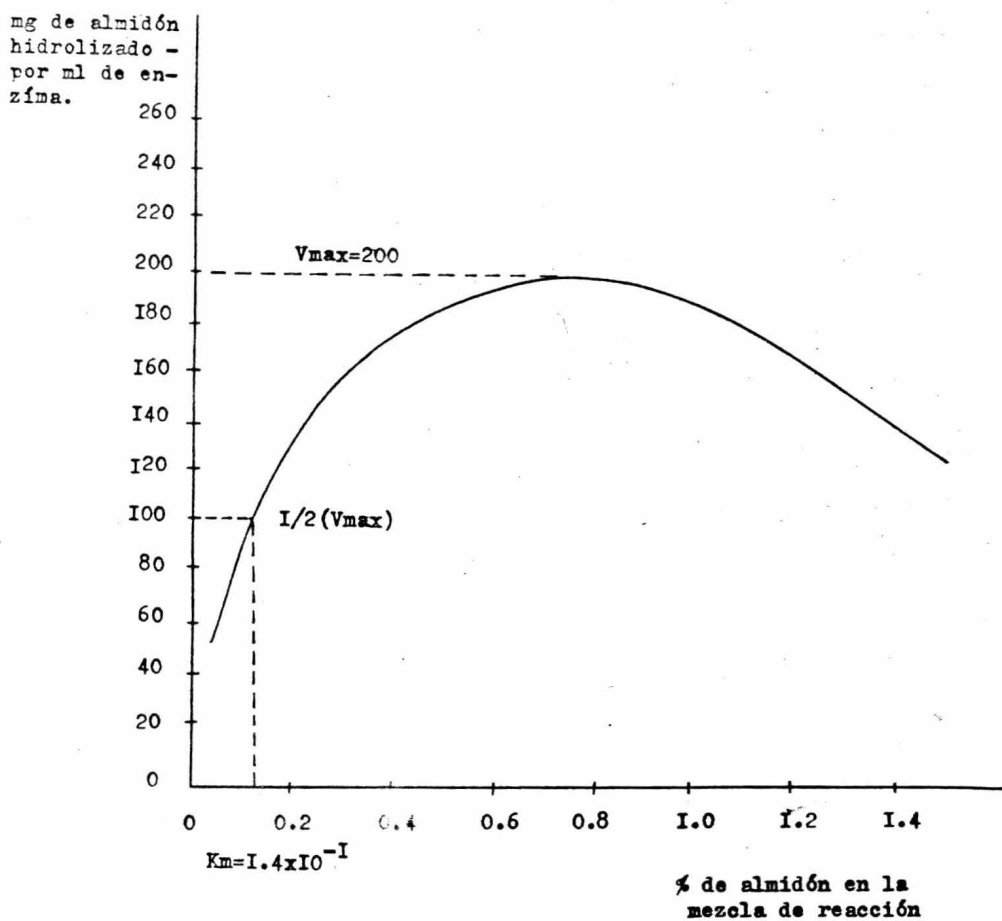
- i) Método directo en la gráfica concentración de sustrato-velocidad de hidrólisis.

$$K_m = 7.0 \times 10^{-1} \quad ; \quad V_{max} = 2.80 \text{ (gráfica 24)}$$

- ii) Lineweaver-Burk, usando mínimos cuadrados:

$$K_m = 6.64 \times 10^{-1} \quad ; \quad V_{max} = 2.20 \text{ (cuadro 34 y gráfica 25)}$$

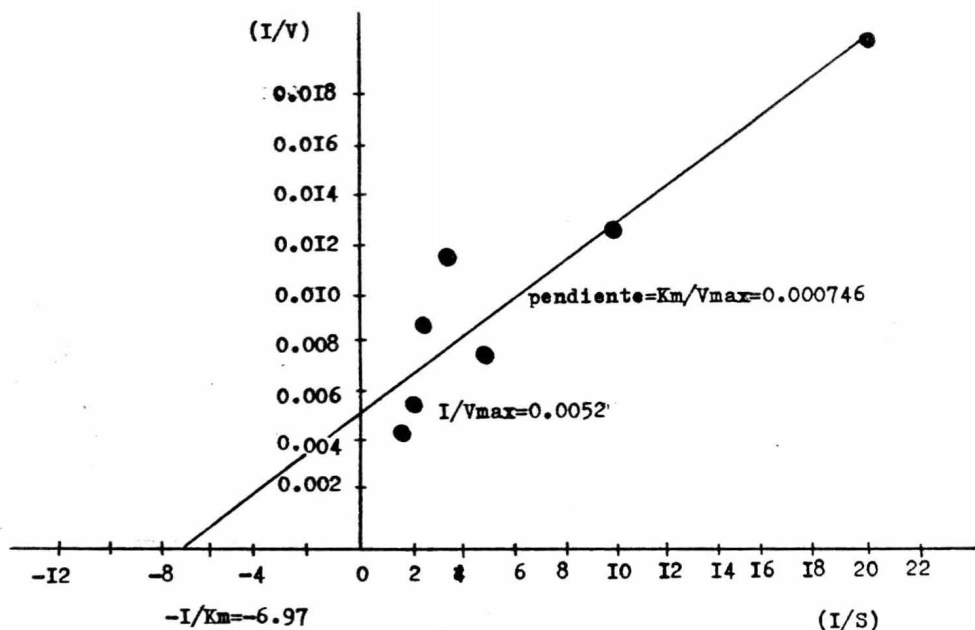
GRAFICA 20. CALCULO DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  PARA LA REACCION ENZIMATICA  
 MENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA FUNGICA. METO-  
 DO GRAFICO DIRECTO.



CUADRO 31. DATOS PARA EL CALCULO DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  PARA LA REACCION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA FUNGICA. METODO DE LINEWEAVER-BURK USANDO MINIMOS CUADRADOS.

$I/v$	$I/s$	$(I/v)(I/s)$	$(I/s)^2$
0.0200	20.00	0.4000	400.00
0.0123	10.00	0.1230	100.00
0.0075	5.00	0.0375	25.00
0.0113	3.33	0.0376	11.08
0.0088	2.50	0.0220	6.25
0.0055	2.00	0.0110	4.00
0.0042	1.66	0.0069	2.75
0.0696	44.490	0.638	524.08

GRAFICA 2I. CALCULO DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  PARA LA REACCION ENZIMATICA MENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA FUNGICA. METODO DE LINEAWEAVER-BURK USANDO MINIMOS CUADRADOS.



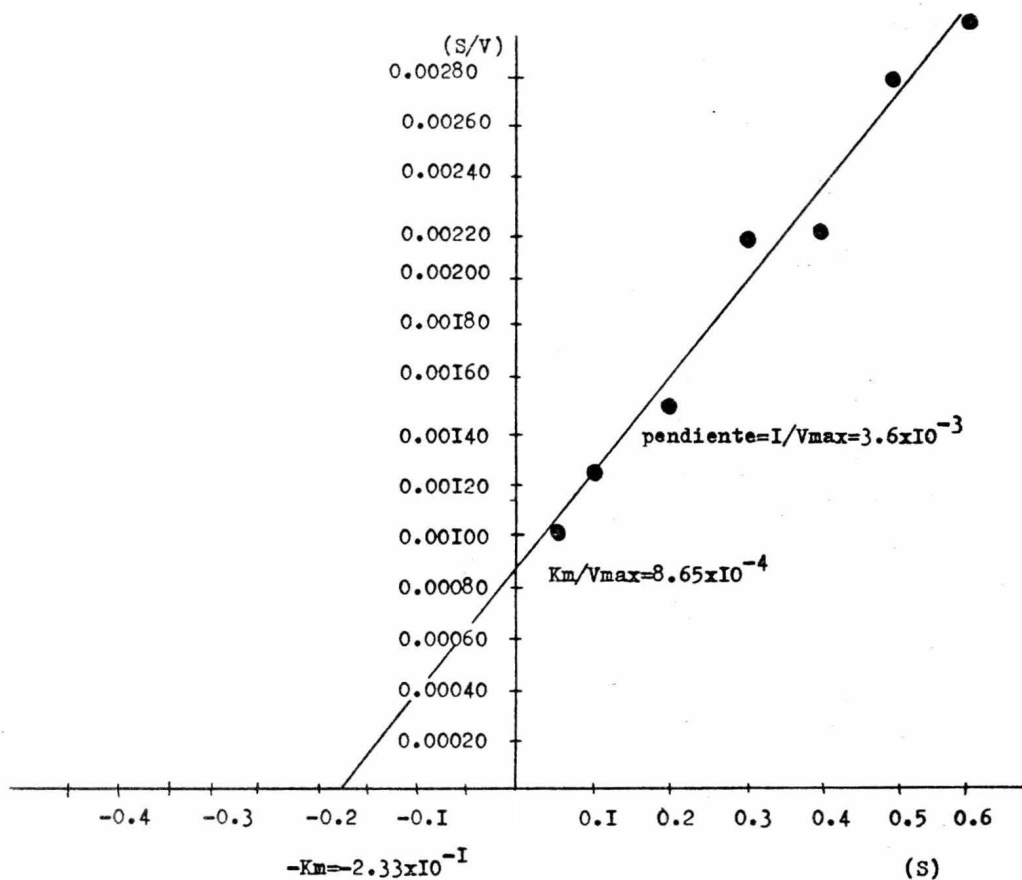
Ecuación obtenida por mínimos cuadrados:

$$(I/V) = 0.000746 (I/S) + 0.0052$$

CUADRO 32. DATOS PARA EL CALCULO DE Km Y Vmax PARA LA -  
 REACCION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-  
 AMILASA FUNGICA. METODO DE AUGUSTINSSON USANDO  
 MINIMOS CUADRADOS.

(s/v)	s	s(s/v)	s <sup>2</sup>
0.05	1.00x10 <sup>-3</sup>	5.0x10 <sup>-5</sup>	25x10 <sup>-4</sup>
0.10	1.23x10 <sup>-3</sup>	12.3x10 <sup>-5</sup>	100x10 <sup>-4</sup>
0.20	1.50x10 <sup>-3</sup>	30.0x10 <sup>-5</sup>	400x10 <sup>-4</sup>
0.30	2.14x10 <sup>-3</sup>	63.2x10 <sup>-5</sup>	900x10 <sup>-4</sup>
0.40	2.18x10 <sup>-3</sup>	87.2x10 <sup>-5</sup>	1600x10 <sup>-4</sup>
0.50	2.79x10 <sup>-3</sup>	139.5x10 <sup>-5</sup>	2500x10 <sup>-4</sup>
0.60	3.04x10 <sup>-3</sup>	182.4x10 <sup>-5</sup>	3600x10 <sup>-4</sup>
2.15	13.88x10 <sup>-3</sup>	519.6x10 <sup>-5</sup>	9125x10 <sup>-4</sup>

GRAPICA 22. CALCULO DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  PARA LA REACCION ENZIMATICA  
 MENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA FUNGICA. METO-  
 DO DE AUGUSTINSSON USANDO MINIMOS CUADRADOS.



Ecuación obtenida por mínimos cuadrados:

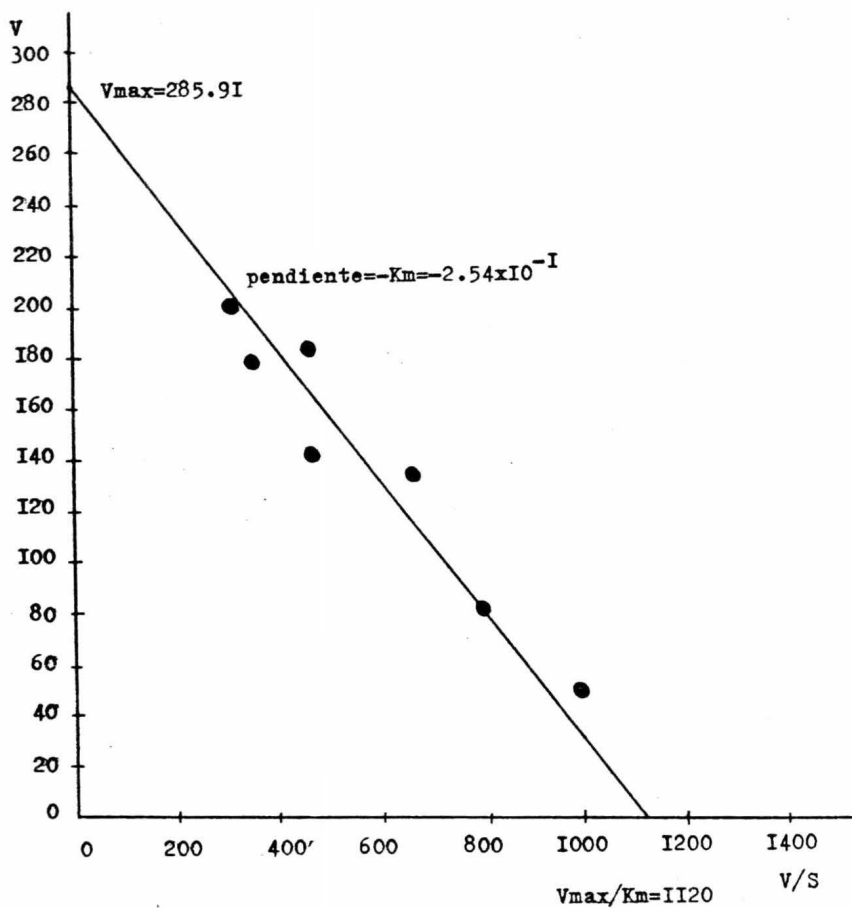
$$(S/V) = 8.65 \times 10^{-4} + 3.6 \times 10^{-3} (S)$$



CUADRO 33. DATOS PARA EL CALCULO DE  $K_m$  y  $V_{max}$  PARA LA REACCION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA FUNGICA. METODO DE EADIE O HOFSTEE - USANDO MINIMOS CUADRADOS.

V	v/s	v(v/s)	$(v/s)^2$
50.0	1,000	50,000	1'000,000
81.1	811	65,772	657,721
133.0	665	88,445	442,225
140.0	466	65,240	217,156
183.0	457	83,631	208,849
179.1	358	64,082	128,164
197.4	329	64,944	108,241
963.60	4,086	462,114	2'762,356

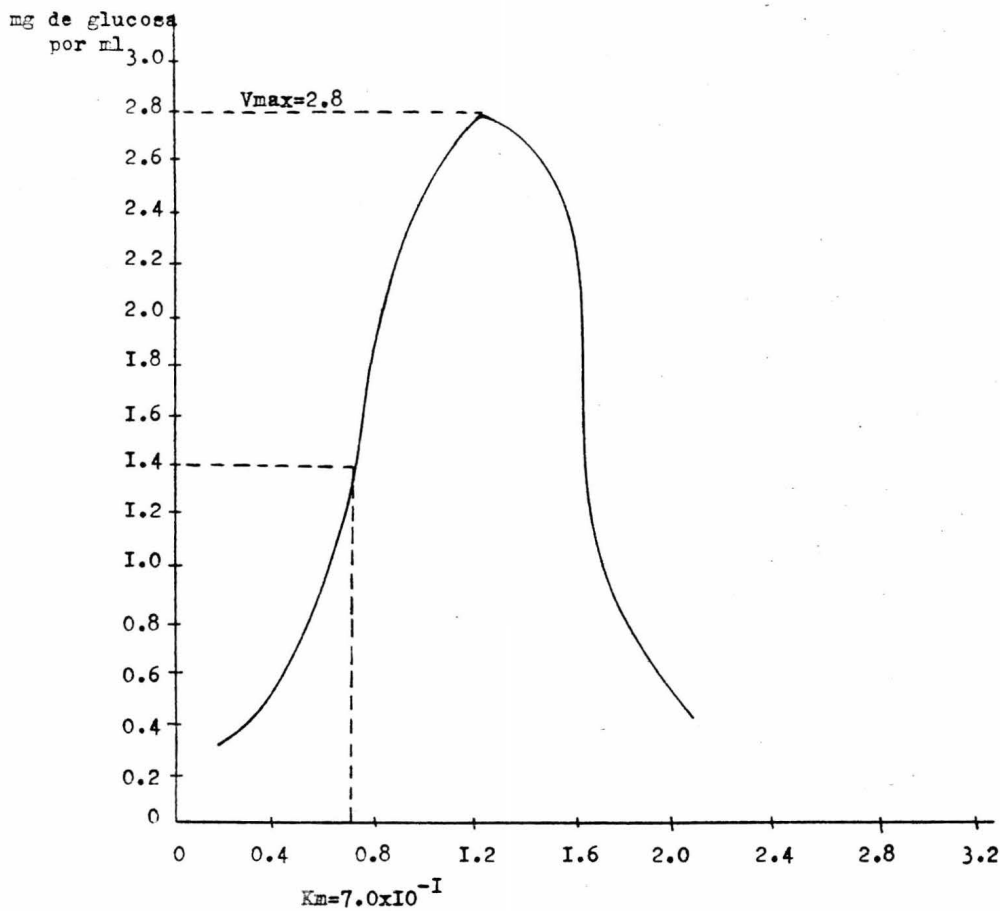
GRAFICA 23. CALCULO DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  PARA LA REACCION ENZIMATICA MENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA FUNGICA. METODO DE EADIE O HOPSTEE USANDO MINIMOS CUADRADOS.



Ecuación obtenida por mínimos cuadrados:

$$V = 285.91 - 2.54 \times 10^{-1} (V/S)$$

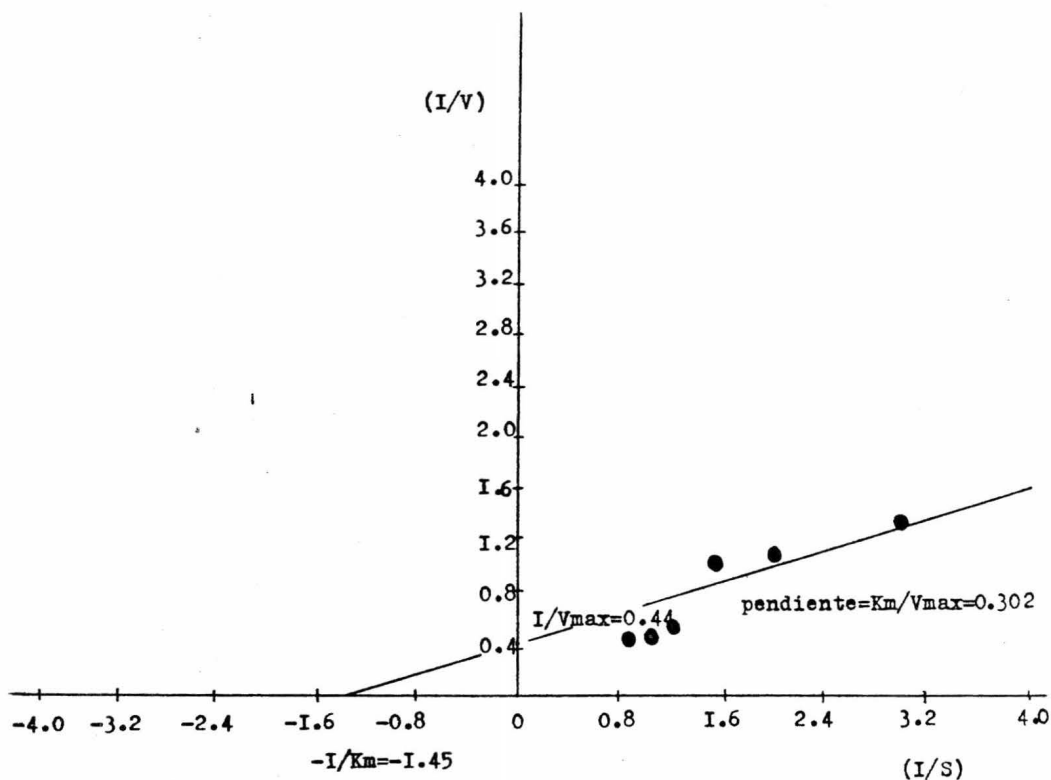
GRAFICA 24. CALCULO DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  PARA LA REACCION ENZIMATICA  
MENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA BACTERIANA. ME  
TODO GRAFICO DIRECTO.



CUADRO 34. DATOS PARA EL CALCULO DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  DE LA REAC-  
 CION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILA  
 SA BACTERIANA. METODO DE LINEWEAVER-BURK USAN  
 DO MINIMOS CUADRADOS.

$(I/v)$	$(I/s)$	$(I/v)(I/s)$	$(I/s)^2$
3.63	12.50	45.37	156.25
3.57	5.88	20.99	34.57
1.38	3.03	4.18	9.18
1.14	2.00	2.28	4.00
1.12	1.49	1.66	2.22
0.53	1.20	0.63	1.44
0.52	1.00	0.52	1.00
0.42	0.85	0.35	0.72
0.35	0.75	0.25	0.56
12.66	28.70	76.23	209.94

GRAFICA 25. CALCULO DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  PARA LA REACCION ENZIMATICA MENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA BACTERIANA. METODO DE LINEWEAVER-BURK USANDO MINIMOS CUADRADOS.



Ecuación obtenida por mínimos cuadrados:

$$(I/V)=0.44+0.302(I/S)$$

iii) Augustinsson, usando mínimos cuadrados:

$$K_m = 6.0 \times 10^{-1} ; V_{max} = 1.78 \text{ (cuadro 35 y gráfica 26)}$$

IV) Eadie o Hofstee, usando mínimos cuadrados:

$$K_m = 0.36 \times 10^{-1} ; V_{max} = 1.41 \text{ (cuadro 36 y gráfica 27)}$$

### ✓ CALCULO DE LOS pKs DE LOS GRUPOS PROTOTRÓFICOS. ]

El cálculo de los pKs de los grupos prototróficos de la enzima se hizo usando los métodos siguientes:

- i) Directamente en la gráfica del efecto del pH sobre la velocidad de hidrólisis del sustrato.
- ii) Solución analítica de las funciones pH de Michaelis. La ecuación correspondiente es la ecuación III.

$$\frac{V_{max}}{H^+} = 1.0 + \frac{H}{K_1} + \frac{K_2}{H^+} \dots\dots\dots \text{(III)}$$

- iii) Solución gráfica de las funciones pH de Michaelis. - Las funciones son IV y V.

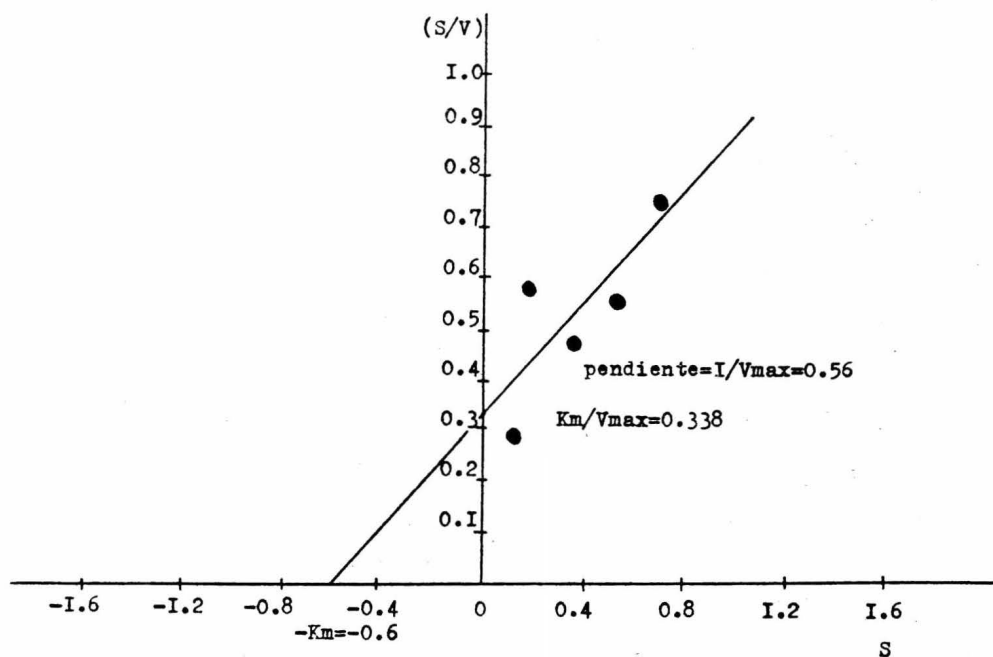
$$\frac{1.0}{\frac{H^+}{V_{max}}} = \frac{1.0}{V_{max}} + \frac{H^+}{V_{max}K_1} \dots\dots\dots \text{(IV)}$$

$$\frac{1.0}{\frac{H^+}{V_{max}}} = \frac{1.0}{V_{max}} + \frac{K_2}{V_{max}H^+} \dots\dots\dots \text{(V)}$$

CUADRO 35. DATOS PARA EL CALCULO DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  PARA LA -  
 REACCION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-  
 AMILASA BACTERIANA. METODO DE AUGUSTINSSON\_  
 USANDO MINIMOS CUADRADOS.

$s/v$	$s$	$(s/v)s$	$s^2$
0.290	0.08	0.023	0.0064
0.607	0.17	0.103	0.0289
0.458	0.33	0.151	0.1089
0.568	0.50	0.284	0.2500
0.752	0.67	0.503	0.4489
2.675	1.75	1.064	0.8431

GRAFICA 26. CALCULO DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  PARA LA REACCION ENZIMATICA MENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA BACTERIANA. METODO DE AUGUSTINSSON USANDO MINIMOS CUADRADOS.



Ecuación obtenida por mínimos cuadrados:

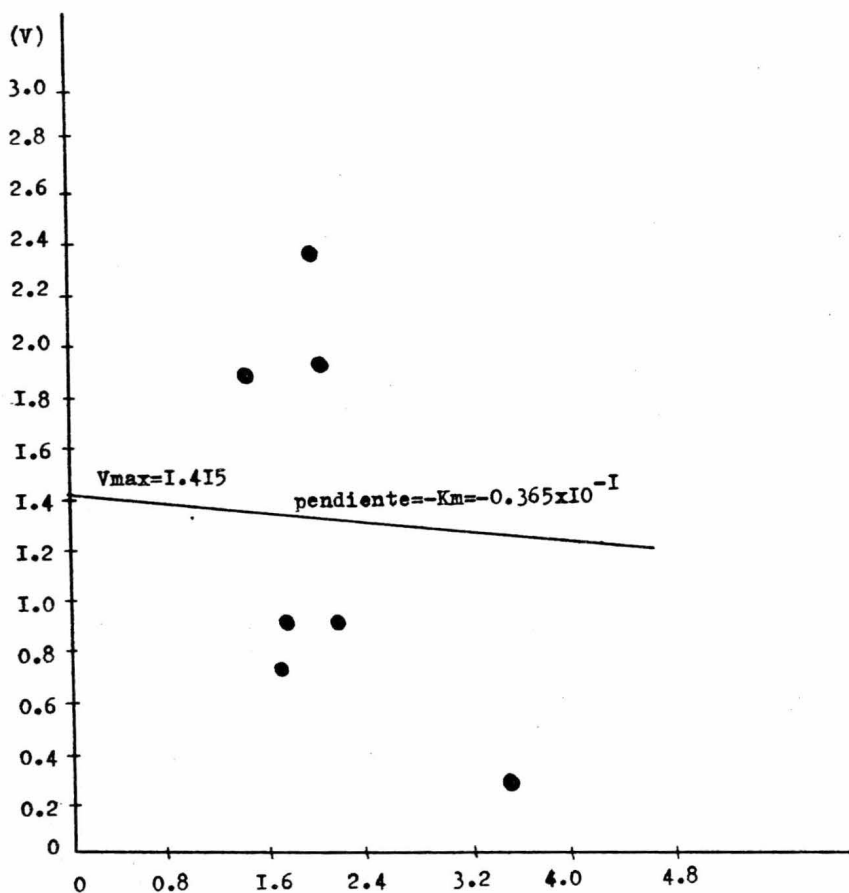
$$(S/V) = 0.338 + 0.56(S)$$



CUADRO 36. DATOS PARA EL CALCULO DE  $K_m$  y  $V_{max}$  DE LA REACCIÓN ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA BACTERIANA. METODO DE EADIE O HOFSTEE - USANDO MINIMOS CUADRADOS.

$v$	$v/s$	$v(v/s)$	$(v/s)^2$
0.275	3.437	0.945	11.812
0.280	1.647	0.461	2.712
0.720	2.181	1.570	4.756
0.880	1.660	1.460	2.755
0.890	1.328	1.181	1.763
1.860	2.240	4.166	5.017
1.920	1.920	3.686	3.686
2.370	2.025	4.799	4.100
2.870	2.157	6.190	4.652
12.065	18.595	24.458	41.253

GRAFICA 27. CALCULO DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  PARA LA REACCION ENZIMATICA  
 CAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA BACTERIANA.  
 METODO DE EADIE O HOPSTEE USANDO MINIMOS CUADRA  
 DOS.



Ecuación obtenida por mínimos cuadrados:

$$(v) = 1.415 - 3.65 \times 10^{-2} (v/s)$$

Los resultados obtenidos a partir de los datos experimentales son los siguientes:

Reacción de hidrólisis de almidón catalizada por alfa-amilasa fúngica:

i) Solución gráfica directa:

$$pK_1 = 3.95 \quad ; \quad pK_2 = 6.70 \quad (\text{gráfica 28})$$

ii) Solución analítica de la función pH de Michaelis:

$$pK_1 = 3.31 \quad ; \quad pK_2 = 5.94 \quad (\text{cuadro 37})$$

iii) Solución gráfica de la función pH de Michaelis:

$$pK_1 = 3.06 \quad ; \quad pK_2 = 6.72 \quad (\text{cuadro 38; gráficas 29 y 30}).$$

Reacción de hidrólisis de almidón catalizada por alfa-amilasa bacteriana:

i) Solución gráfica directa:

$$pK_1 = 4.3 \quad ; \quad pK_2 = 7.6 \quad (\text{gráfica 31})$$

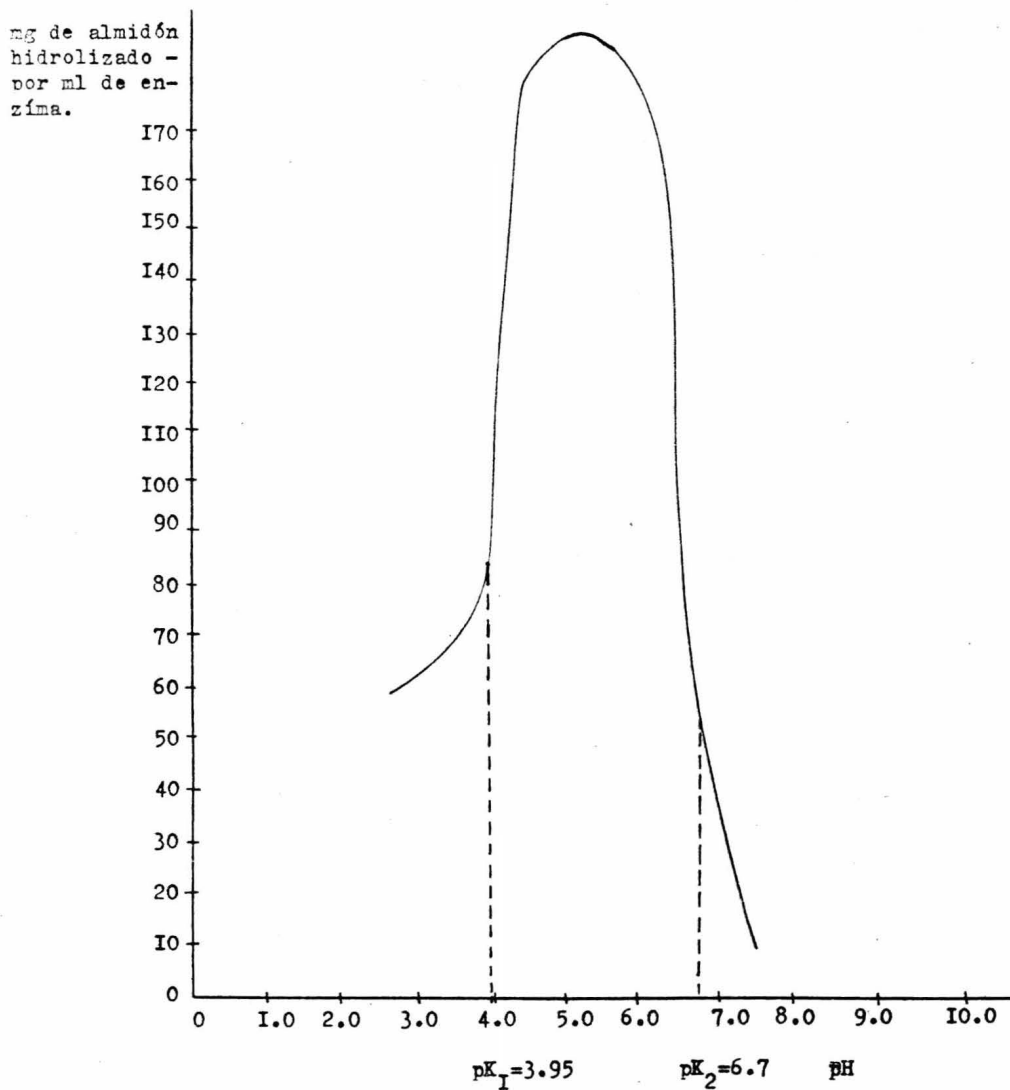
ii) Solución analítica de la función pH de Michaelis:

$$pK_1 = 4.10 \quad ; \quad pK_2 = 5.27 \quad (\text{cuadro 39})$$

iii) Solución gráfica de la función pH de Michaelis:

$$pK_1 = 4.7 \quad ; \quad pK_2 = 5.36 \quad (\text{cuadro 40; gráfica - 32 y 33}). \quad \boxed{1}$$

GRAFICA 28. CALCULO DE pKs PARA LA REACCION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA FUNGICA. SOLUCION - GRAFICA DIRECTA.



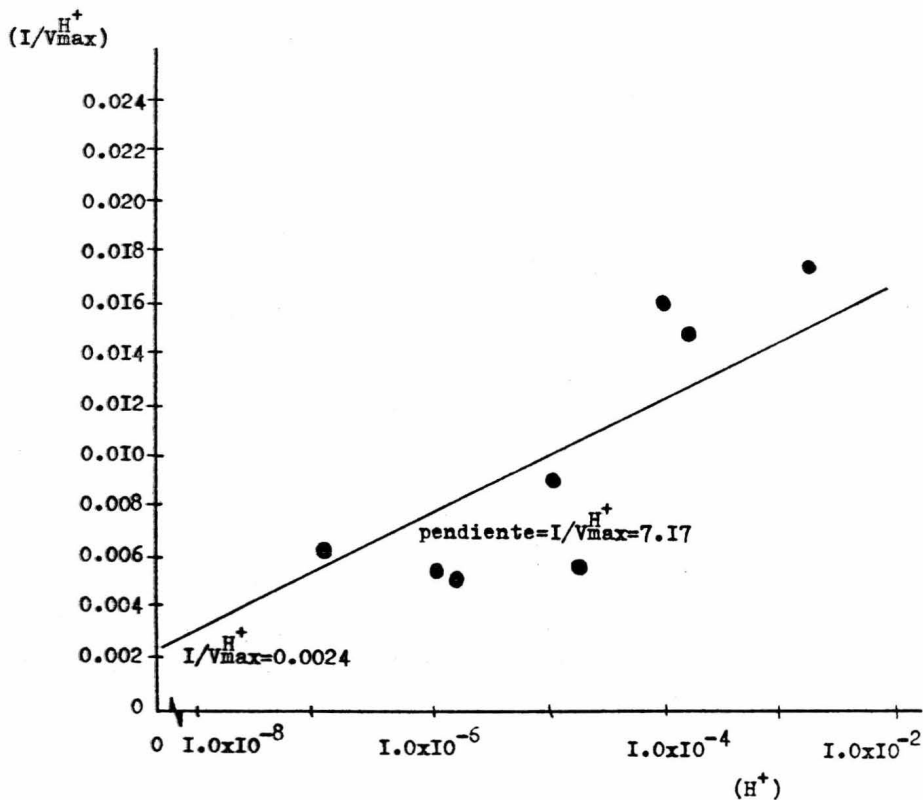
CUADRO 37. DATOS PARA EL CALCULO DE pKs EN LA REACCION - ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA - FUNGICA. SOLUCION ANALITICA DE LA FUNCION DE MICHAELIS.

pH	$\frac{H^+}{V_{max}}$	$(H^+)$
2.5	57.9	0.003100000
3.0	63.2	0.000100000
3.5	68.1	0.000310000
4.0	113.1	0.000010000
4.5	179.5	0.000031000
5.0	188.0	0.000001000
5.5	190.9	0.000003100
6.0	160.4	0.000000100
6.5	45.7	0.000000310
7.0	25.8	0.000000010
7.5	10.6	0.000000031

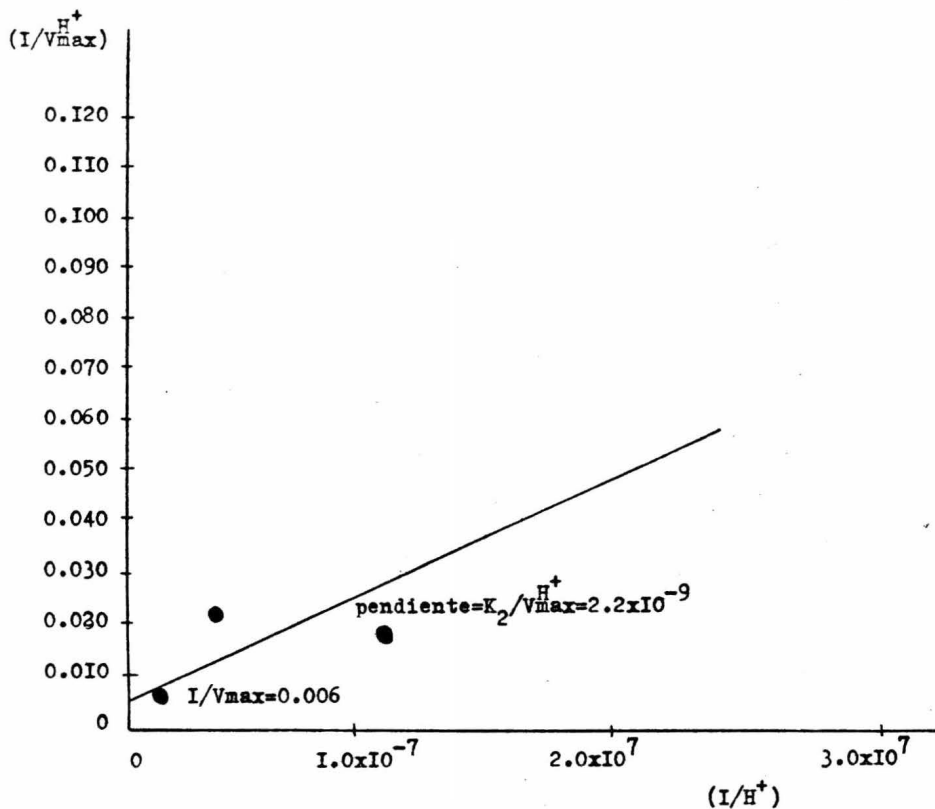
CUADRO 38. DATOS PARA EL CALCULO DE pKs EN LA REACCION - ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA - FUNGICA. SOLUCION GRAFICA DE LA FUNCION DE - MICHAELIS.

pH	$\frac{H^+}{I/V_{max}}$	$(I/H^+)$	$(H^+)$
2.5	0.0172	316	0.003100000
3.0	0.0158	1,000	0.000100000
3.5	0.0146	3,160	0.000310000
4.0	0.0088	10,000	0.000010000
4.5	0.0055	31,600	0.000031000
5.0	0.0053	100,000	0.000001000
5.5	0.0052	316,000	0.000003100
6.0	0.0062	1'000,000	0.000000100
6.5	0.0218	3'160,000	0.000000310
7.0	0.0179	10'000,000	0.000000010
7.5	0.0943	31'600,000	0.000000031

GRAFICA 29. CALCULO DE  $pK_s$  PARA LA REACCION ENZIMATICA  
 MENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA FUNGICA.  
 SOLUCION GRAFICA, DE LA FUNCION DE MICHAELIS.

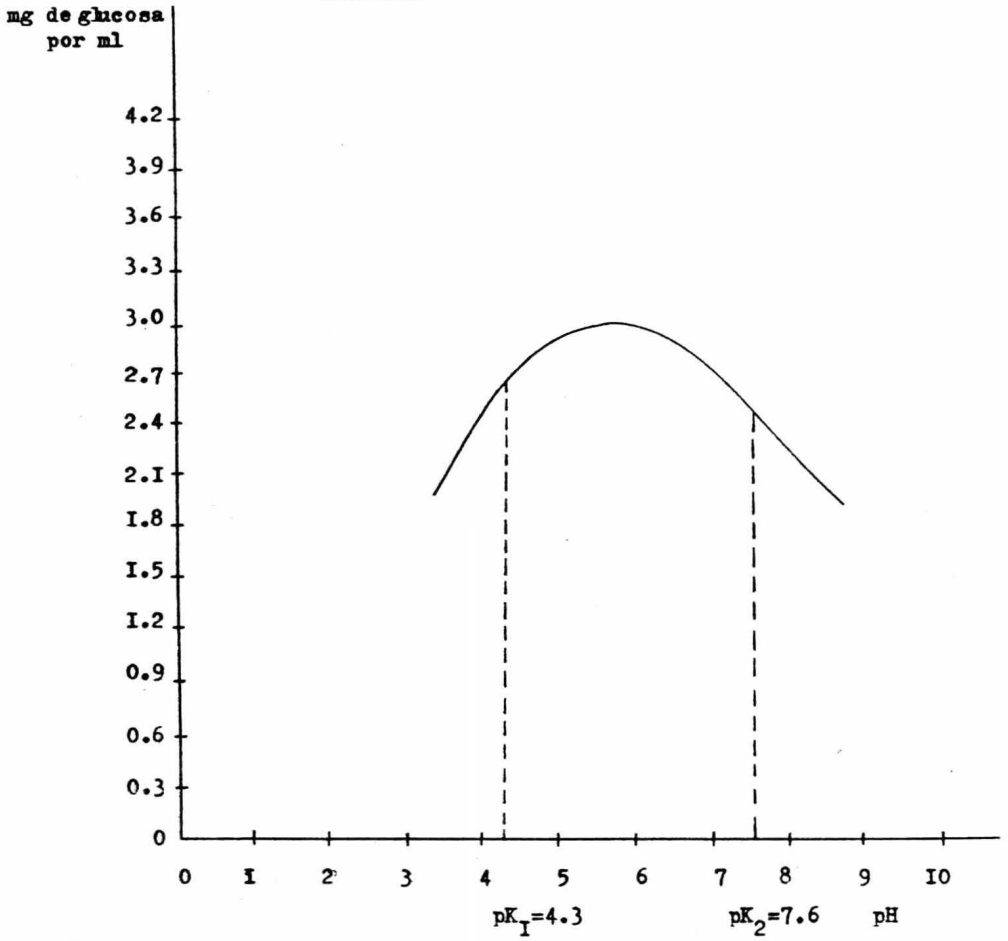


GRAFICA 30. CALCULO DE pKs PARA LA REACCION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA FUNGICA. SOLUCION - GRAFICA DE LA FUNCION DE MICHAELIS.





GRAFICA 3I. CALCULO DE  $pK_s$  PARA LA REACCION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA BACTERIANA. SOLUCION GRAFICA.



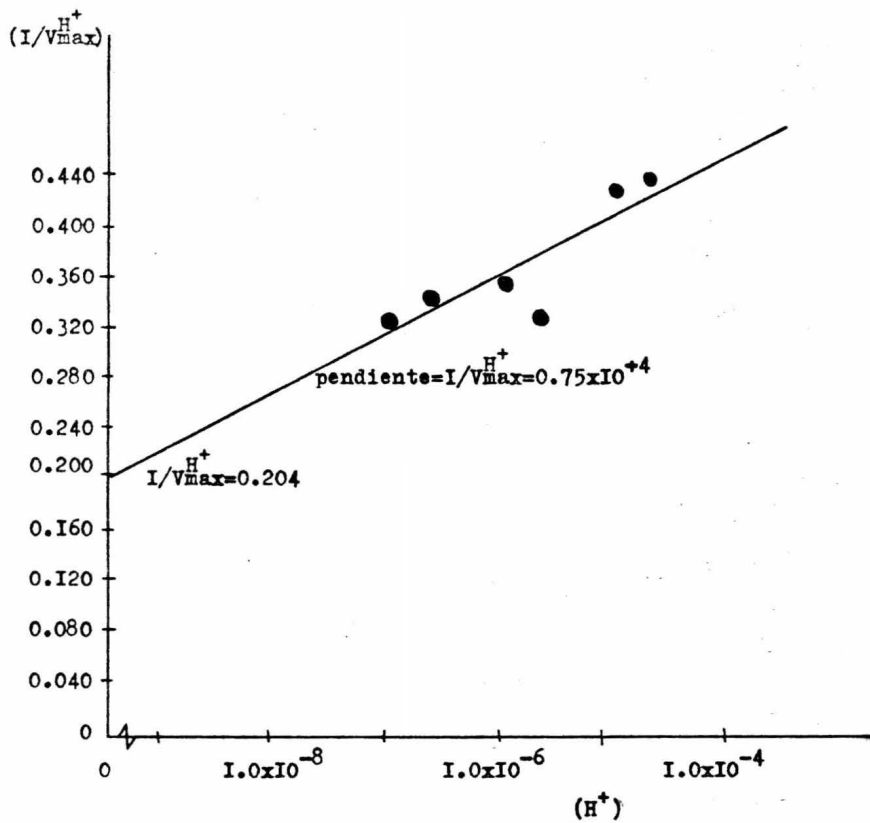
CUADRO 39. DATOS PARA EL CALCULO DE pKs EN LA REACCION - ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA - BACTERIANA. SOLUCION ANALITICA DE LA FUNCION DE MICHAELIS.

pH	$\frac{H^+}{V_{max}}$	$(H^+)$
4.0	2.30	0.0000100000
4.5	2.60	0.0000310000
5.0	2.80	0.0000010000
5.5	3.06	0.0000031000
6.0	3.04	0.0000001000
6.5	2.90	0.0000003100
7.0	2.76	0.0000000100
7.5	2.40	0.0000000310
8.0	2.26	0.0000000010
8.5	2.14	0.0000000031

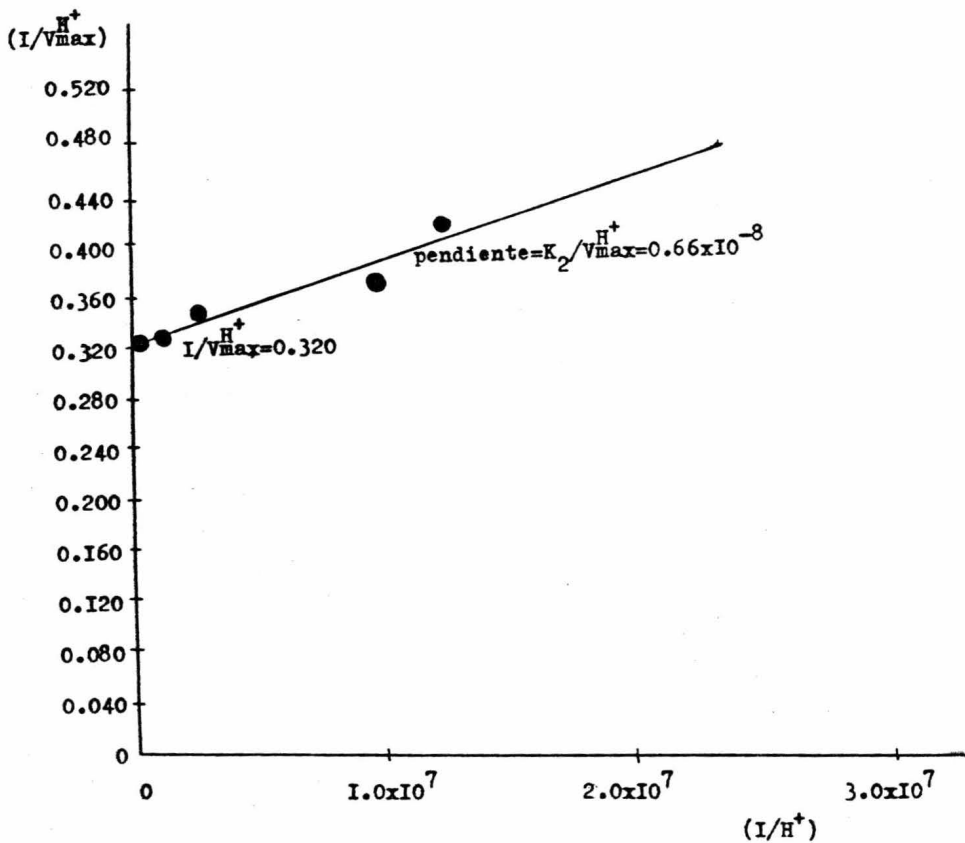
CUADRO 40. DATOS PARA EL CALCULO DE pKs EN LA REACCION -  
 ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA -  
 BACTERIANA. SOLUCION GRAFICA DE LA FUNCION -  
 DE MICHAELIS.

pH	$I/V_{\max}^{H^+}$	$(I/H^+)$	$(H^+)$
4.0	0.43	10,000	0.0000100000
4.5	0.38	31,600	0.0000310000
5.0	0.35	100,000	0.0000010000
5.5	0.32	316,000	0.0000031000
6.0	0.32	1'000,000	0.0000001000
6.5	0.34	3'160,000	0.0000003100
7.0	0.36	10'000,000	0.0000000100
7.5	0.41	31'000,000	0.0000000310
8.0	0.44	100'000,000	0.0000000010
8.5	0.46	316'000,000	0.0000000031

GRAFICA 32. CALCULO DE pKs DE LA REACCION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA BACTERIANA. SOLUCION GRAFICA DE LA FUNCION DE MICHAELIS.



GRAFICA 33. CALCULO DE pKs PARA LA REACCION ENZIMATICAMENTE CATALIZADA POR ALFA-AMILASA BACTERIANA. SOLUCION GRAFICA DE LA FUNCION DE MICHAELIS.



## V. DISCUSION Y RESULTADOS

[La producción máxima de alfa-amilasa se obtuvo a las 36 horas de incubación. Este tiempo es variable, y este valor representa un promedio.]

[La evaporación al vacío es un buen método para concentrar el medio de cultivo fermentado lo cual está de acuerdo con lo reportado por Mazza, L.A., y Balatti, A. (1970). La ultrafiltración es un método adecuado, mediante el cual no sólo se conserva la actividad enzimática sino que se aumenta la actividad específica, y simultáneamente se dializan sales y otros compuestos de bajo peso molecular.]

[Después de dializar la muestra concentrada por evaporación se observa que la actividad específica se incrementa en un 100%. Esto y la apariencia de la muestra antes y después de dializar indican que hay compuestos de bajo peso molecular que actúan como inhibidores, los cuales pueden ser producto de la acción enzimática.]

El perfil de elución obtenido de la columna de DEAE-celulosa indica que el pico de actividad enzimática corresponde a 4 picos de proteínas, sin embargo uno de los picos presenta actividad máxima, obteniéndose una actividad constante debido a que la concentración de almidón fué insuficiente. Además la enzima fué eludida con otras proteínas según el patrón de elución obtenido.

Para el proceso descrito en métodos se obtuvo una purificación de 10.3 veces en base a la actividad específica, y un 7% de recuperación. Se recomienda una purificación adicional en serie con la desarrollada si se desea aumentar el grado de homogeneidad y pureza de la enzima.

[En la caracterización de la alfa-amilasa de Aspergillus oryzae se observa que a concentraciones mayores -

de 0.8% de almidón se tiene un efecto inhibitorio. Este efecto también se encontró al caracterizar la alfa-amilasa comercial. En la literatura consultada no hay reportes al respecto, pero puede considerarse real y puede deberse a un aumento en la viscosidad del medio o a una velocidad mayor con la consiguiente producción de materiales de bajo peso molecular que inhiben la actividad de la enzima. ]

Se obtuvo un valor de  $K_m$  de  $1.5 \times 10^{-1}$  para la acción de alfa-amilasa fúngica, y un  $K_m$  del orden de  $10^{-1}$  para la alfa-amilasa bacteriana. Estos valores transformados a unidades molares, considerando que el peso molecular del sustrato es de  $5 \times 10^4$  a  $1.5 \times 10^5$ , se obtiene un valor de  $K_m$  del orden de  $10^{-5}$ , lo cual indica una alta afinidad de la enzima por el sustrato.

[El pH óptimo para actividad máxima obtenido en la enzima purificada fué de 5.0, y el de la enzima comercial fué de 5.9, lo cual está de acuerdo con el valor de 4.8 a 5.8, y de 5.85 a 6.00 que se reporta, respectivamente, para las dos enzimas. Los valores de  $pK_1$  se encuentran dentro de los límites reportados para grupo carboxilo y, similarmente, los valores de  $pK_2$  obtenidos a partir de los datos experimentales caen dentro de los límites asignados a un grupo imidazol de histidina.]

[La temperatura óptima para la hidrólisis del almidón catalizada por alfa-amilasa fúngica es de  $50^\circ\text{C}$ , lo cual concuerda con lo reportado en la literatura respecto a alfa-amilasa de Aspergillus oryzae con un sustrato resistente a temperaturas medias. A  $90^\circ\text{C}$  la enzima se inactiva en casi un 100%. La temperatura óptima correspondiente a alfa-amilasa de Bacillus subtilis catalizando la hidrólisis de su sustrato es de  $55^\circ\text{C}$ , sin embargo a  $90^\circ\text{C}$  se observa una actividad residual mayor que la correspon-



diente a la alfa-amilasa fúngica. En la literatura se reporta que la alfa-amilasa de Bacillus subtilis resiste mayores temperaturas que la de Aspergillus oryzae. ]

Los valores de energía de activación no son muy - diferentes, y los valores de  $Q_{10}$  siguen la tendencia de - decrecer conforme se incrementa la temperatura, reprodu-- ciéndonos tal resultado un desplazamiento de un equili-- brio hacia una alta concentración de enzima desnaturaliza-- da, y por tanto sin actividad. Al adicionar cloruro de - calcio no se observó un efecto de activación, sino que a - concentraciones mayores de 0.05 se observa una disminu-- ción en la actividad, lo cual puede atribuirse a la fuer-- za iónica del medio. También influye el hecho de que se - trabajó en pH óptimo, esto es, se podría haber observado - un efecto si se trabaja con diferentes pH y, simultánea-- mente, diferentes concentraciones de cloruro de calcio.

{ El efecto observado del cloruro de sodio sobre la actividad de alfa-amilasa bacteriana, usando como sustra-- to almidón, es cualitativamente similar al efecto del clo-- ruro de calcio sobre alfa-amilasa fúngica. A concentra-- ciones de 1.0 M se empieza a observar una inhibición sig-- nificativa. }

{ Con respecto a la concentración de enzima se ob-- serva que tanto la alfa-amilasa fúngica como la bacteria-- na siguen la cinética normal. }

Con la variable tiempo también se observó la ciné-- tica característica. A los 20 minutos y más ya no hay hi-- drólisis del almidón en el caso de las dos enzimas.

## VI. RESUMEN

La cepa de Aspergillus oryzae 12802-ATCC estudiada, produce alfa-amilasa en un medio sintético (Czapeck--almidón) a las 36 horas de incubación en un agitador recíproco y a 28°C.

La alfa-amilasa puede concentrarse adecuadamente a partir del extracto crudo (medio de fermentación filtrado) mediante evaporación al vacío o por ultrafiltración.

El método de purificación por cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa se recomienda como una primera etapa en el proceso de purificación.- Por otra parte, antes del método de intercambio iónico - puede usarse un fraccionamiento en sephadex.

Se caracterizó la alfa-amilasa fúngica obteniendo se los siguientes resultados:

En la investigación del efecto de cada variable - sobre la reacción de hidrólisis se trabajó con las siguientes condiciones:

Concentración de sustrato .....	0.5%
Concentración de enzima .....	0.1 ml
	de solución enzimática en 10 ml de la
	mezcla de reacción.
pH .....	4.6
Temperatura .....	30°C
Concentración de cloruro de calcio .....	0.05 M.
Tiempo .....	10 min.

Variando el parámetro respectivo se obtuvieron - los resultados a continuación presentados:

Concentración óptima de sustrato .....	0.8 %
Concentración óptima de enzima .....	1.0 ml
	de solución enzimática en 10
	ml de mezcla de reacción.

pH óptimo .....	5.0
Temperatura óptima .....	55°C
Concentración óptima de cloruro de calcio .....	0.04 M
Energía de activación.....	2,780 cal/mol.
$Q_{10max} = 1.27$ (de 40 a 50°C)	

$K_m = 1.4 \times 10^{-1}$  (expresado como % masa la concentración del sustrato  $pK_1 = 3.3$  ;  $pK_2 = 6.6$ )

Se caracterizó alfa-amilasa comercial de origen bacteriana, usando las siguientes condiciones:

Concentración de sustrato .....	0.03 %
Concentración de enzima .....	0.416
	gramos de enzima/ml.
pH .....	6.9
Temperatura .....	30°C
Tiempo .....	30 min.

Los resultados óptimos para actividad máxima fueron:

Concentración de sustrato .....	1.2%
Concentración de enzima .....	-
pH .....	5.5
Temperatura .....	55°C
Concentración de cloruro de sodio .....	0.0003M
Tiempo .....	20 min.
Energía de activación = 1,991 cal/mol	

$Q_{10max} = 1.96$  (de 15 a 25°C)

$K_m = 7.0 \times 10^{-1}$  (expresado como % masa la concentración del sustrato).

$pK_1 = 4.5$  ;  $pK_2 = 5.3$

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- AKABORI, S. et al. (1955). Journal Gen. Apl. Microbiology. 1:1.
- 2.- AKABORI, S. et al. (1956). Journal of Biochemistry (Tokyo). 41:741.
- 3.- AKABORI, S., IKENAKA, T., and HAGINARA, B. (1954). - Journal of Biochemistry (Tokyo). 41:577.
- 4.- ARIMA, K. (1964). "Microbial Enzyme Production" in Global impacts of applied microbiology. Edited by Starr, P.M. London.
- 5.- AURAND, L.N., and WOODS, A.E. (1973). "Food Chemistry". The AVI Publishing Co. Inc. Westport, Conn. U.S.A.
- 6.- BANKS, G.T., BINNS, F., and CUTCLIFFLE, R.L. (1967). - "Recent development in the production and industrial applications of amylolytic enzymes derived from filamentous fungi", in Progress in Industrial microbiology. Edited by Moikenhull, D.J.D. Vol. 61 London.
- 7.- BERNFELD, P. (1951). Advances in Enzymology. 12:379.
- 8.- CALDWELL, M. L. (1945). Journal of the American Chemistry Society. 67.
- 9.- CALDWELL, M.L. (1945). Journal of the American Chemistry Society. 74:4033.
- 10.- CAMPBELL, L. L. (1954). Journal of the American Chemistry Society. 76:5256.

- ✓ 11.- CONN, E. E., STUMPF, P. K. (1972). "Bioquímica Fundamental". Segunda edición. Editorial Limusa-Wiley, S. A. México, D.F.
- 12.- Del CASTILLO, M. L. (1975). Comunicación Personal.- México, D.F.
- 13.- De PINTO, J. A., and CAMPBELL, L. L. (1968). Biochemistry. 7:114.
- 14.- FISCHER, E. M., DUCKERT, F., and BERNFELD, P. (1954). Helv. Chimn Acta. 30 64.
- 15.- FISCHER, E. M. and STEIN, E. A. (1960). "Alfa-amylases" in the Enzymes, edited by Paul D. Boyer. Academic - Press, New York.
- 16.- FUKUMOTO, S., and OKADA, S. L. (1963). Journal of - Fermentation Technology. 41:427.
- 17.- FUWA, E. M. (1954). Journal of Biochemistry (Tokyo).- 41:583.
- 18.- HAGIHARA, B. et al (1956). Journal of Biochemistry - (Tokyo). 43:483.
- 19.- HANAHUSA H., IKENAKA, T., and AKADORI, S. (1955). - Journal of Biochemistry (Tokyo). 42:55.
- 20.- HANRAHAN, V.M., and CANDWELL, M.L. (1953). Journal - of the American Chemistry Society. 76:4030.
- 21.- HEATLEY, N. G. (1958). Nature. 181:1069.
- 22.- HIRCHERBERG, L.M. (1957). "Fungal amylases in the bakery". Food. 26: 130-32.

- 23.- HSIU, J. et al (1964). Biochemistry. 3:61.
- 24.- KATO, I. et al (1967). Proce. Jap. Acad. 43:38.
- 25.- KOGIMA, H., and SUNGAE, K. (1968). Journal of Biochemistry (Tokyo). 64:712.
- 26.- KOSHLAND, Jr. D.E. (1954). In "The mechanism of enzyme action" edited by W.D. Mc. Elroy and B. Glass. - John Hopkins Press, Baltimore.
- 27.- LAIDLER, K. J. (1955). Trans. Faraday, Soc. 56:528--540.
- 28.- LARNER, J., and MAYER, F. C. (1958). B.B.A. 29:405.
- 29.- LOOKWOOD, A. R. (1961). "Production of fungal amylases and its use in the supplementation of bread flour" Society of Chemical Industry, Monograph No. - II, London.
- 30.- LOWRY, O. H. et al. (1951). Journal of Biological Chemistry. 193:265-275.
- 31.- MARKOVITZ, A., KLEIN, H. P., and FISCER, E. H. - (1956) B.B.A. 19:267.
- 32.- MATSUBARA, S. et al (1959). Journal of Biochemistry (Tokyo). 43:425.
- 33.- MAZZA, L.A., y BALATTI, A.P. (1970). "Enzimas amilolíticas fúngicas". Revista Latinoamericana de Microbiología. 12: 181-87.
- 34.- MAZZA, L.A., BALATTI, A.P., y CUEVAS, C. (1967). - "Función del oxígeno en procesos fermentativos". - Ion. 27:497-501.



- 35.- MINODA, Y. et al. (1968). Agri. Biol. Chem. (Tokyo). 32:110.
- 36.- NARITA, K. et al. (1966). Journal of Biochemistry - (Tokyo). 59:170.
- 37.- OGASAMARA, K., IMANISHI, A., and ISEMURA, T.J. - (1968). Journal of Biochemistry (Tokyo) 67:65.
- 38.- OIKAWA, A., and MAEDA, A. (1957). Journal of Biochemistry (Tokyo). 44:745.
- 39.- OKADA, S. et al. (1968). J. Agr. Chem. Soc. Japan. 42:655.
- 40.- ONO, K. et al. (1958). Bull. Chem. Soc. Japan. - 31:957.
41. PONTECORBO, G., ROPER, J. A., y FORBES, M. (1953).- "Genetics recombinations without sexual reproduction in Aspergillus niger" Journal of General Microbiology. 8:198-210.
- 42.- RADICHEVITCH, I. et al. (1959). J.A.C.S. 81:2845.
- 43.- BOBYT, J., and FRENCH, D. (1959). A.B.B. 104:338.
- 44.- SCHWIMMER, S., and BALLS, A.K. (1969). Journal of - Biological Chemistry. 179:1063.
- 45.- STEIN, E.A., et al. (1964) Biochemistry. 3:56.
- 46.- STEIN, E.A., and FISCHER, E.A. (1958). Journal of - Biological Chemistry. 232:867.