



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## "ESTUDIO DE INHIBIDORES DE AMILASA EN GRANOS DE MAIZ"

239

T E S I S

Que para obtener el título de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
p r e s e n t a :  
FRANCISCA AIDA ITURBE CHIÑAS



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

TESIS

ADG H.C.

FECHA 243

PROG 243



QUIMICA

A mi Padre,

A mi madre,

A mis hermanos,

A mis Amigos y Compañeros,

y  
a Carlos.

Agradeciendo la inapreciable ayuda de:

Dr. Alejandro Blanco por la orientación y ayuda en la ejecución de este trabajo.

Dra. Ma. Luisa Ortega por proporcionar los granos de maíz -  
estudiados.

Dra. Cynthia Ann Cowhill y Dr. Kith Varty por su participación y consejos en la evaluación preliminar del presente trabajo.

Y a todas las personas que de una manera u otra contribuyeron a la realización de esta tesis.

PRESIDENTE,	Profra. NINFA GUERRERO DE CALLEJAS.
V O C A L ,	Profr. ALEJANDRO BLANCO LABRA.
SECRETARIO,	Profr. RUBEN BERRA GARCIA COSS.
1er. SUPLENTE,	Profr. VICTORIA VALLES DE BOURGES.
2o. SUPLENTE,	Profr. ALEJANDRO GARDUÑO TORRES.

Depto. de Bioquímica, D.E.S. Fac. de Química UNAM.

Francisca Aida Iturbe Chiñas.

*Francisca Aida Iturbe Chiñas*

Dr. Alejandro Blanco Labra.

*Alejandro Blanco Labra*

## C O N T E N I D O

I. - OBJETIVOS	1
II. - GENERALIDADES	
MAIZ .....	2
ENZIMAS AMILOLITICAS .....	15
INHIBIDORES ENZIMATICOS .....	27
ESTUDIO DE FACTORES ANTIAMILOLITICOS EN ALIMENTOS.	35
III. - MATERIALES Y METODOS.	
MATERIALES .....	51
APARATOS .....	53
METODOS .....	54
IV.. - RESULTADOS Y DISCUSIONES	60
V. - CONCLUSIONES.	79
APENDICE.	82
BIBLIOGRAFIA.	99

## I. - O B J E T I V O

Debido a la gran importancia de los inhibidores enzimáticos en los procesos de germinación, regulación y protección de las plantas, el presente trabajo tiene como objetivo el de estudiar la posible presencia de algún inhibidor de enzimas amilolíticas en granos de maíz. Este cereal fué escogido por ser uno de los principales productos alimenticios consumidos en México, y por lo tanto, el estudio de factores que regulen su producción, así como la protección contra plagas, resulta sumamente interesante.

El objeto de estudiar la presencia de un inhibidor natural de enzimas amilolíticas deriva del papel tan importante que tienen estas enzimas en la germinación de los cereales, ya que la principal fuente de energía almacenada en estos granos se encuentra en forma de almidón, y como se explicará posteriormente, dichas enzimas son las principales causantes de su degradación.

## II. - GENERALIDADES.

### MAIZ. - Historia.

El 3 de noviembre de **1492**, luego de bajar a tierra en la isla Fernandina, dos marineros del almirante Cristóbal Colón, regresaron a su nave con un puñado de maíz. En este momento el Viejo Mundo empezaba a conocer el mágico cereal, dádiva de los dioses americanos y sustancia de hombres y pueblos, que había formado todas las civilizaciones del Nuevo Continente y habría de ayudar en lo sucesivo, a conservar las viejas civilizaciones orientales y europeas. Más tarde, al tratar el tercer viaje de Colón, Martín Fernández de Navarrete transcribe lo siguiente: "...hicieron traer pan y de muchas maneras de frutas e vino ... más no uvas ... y asimismo debe ser dello de maíz, que es una espiga como una mazorca que llevé yo allá, y hay ya mucho en Castilla..."; lo que demuestra que el maíz llegó muy pronto a España y se aclimató de inmediato.

En "La Vida del Almirante Colón" escrita por su hijo don Hernando, aparece el siguiente párrafo: "...y que había muchas simientes ... y de otro grano, como panijo, llamado por ellos maíz, que es de buenísimo sabor, cocido o tostado, o molido en puches...". Así lo conocieron y admiraron los españoles.

El nombre maíz se deriva del nombre haitiano que lo designa en las islas del Caribe: mahis o mahys, que Linneo adoptó para designar científicamente a la planta como Zea maiz o "Causa de la vida".

Originalmente los huastecos llamaron al maiz-tzis derivado del hombre de la hormiga que según sus le-

yendas, descubrió al grano y lo llevó a los dioses: itizis. De este primitivo nombre huasteco tomaron los aztecas - el que a su vez le dieron, de izis centli, que más tarde transformaron en tzintle, aludiendo al alimento de los dioses o Teocintli. De tzintle deriva la voz atzintzintle, con que a veces se denomina al maíz en los antiguos códices, y de ella nuestro vocablo costumbrista "achichinle", con que se designa al incondicional que se pega a otro "como en mazorca" los granos del maíz.

Los antiguos toltecas, que decían haber encontrado al maíz silvestre en Tamoanchán, donde lo domesticaron y cultivaron, lo llamaron puxpuch, adoptando una vieja voz maya que lo designaba. Pero los huastecos, -- descendientes directos de los antiguos olmecas y en parte de los mayas y toltecas, fueron en realidad los que domesticaron al maíz y lo cultivaron por primera vez, llamándolo to-nacayo, que significa "nuestra carne", porque su leyenda decía que el hombre había sido hecho de maíz por lo dioses.

Parece ser que el maíz apareció sobre la tierra, en México, hace unos 16 000 años, llegando a constituir uno de los tres grandes alimentos del mundo: el trigo del Mediterráneo, que invade primero a Europa, Asia y Africa y que, transportado a América después del descubrimiento, es llevado por el europeo y el americano en sus viajes de exploración y conquista a Oceanía y el Asia Oriental, cerrando el círculo de su difusión; el arroz de China, que conquista al mundo asiático oriental e invade las islas de Oceanía y que, después del descubrimiento de América y del contacto de europeos y asiáticos a través del Nuevo Continente, llega a América y Europa y se difunde por ellas, hasta alcanzar a Asia nuevamente y cerrar otra vez el círculo de la difusión de esta granínea.

Y, por último, el maíz de México, que cultivado primeramente en la región de las Huastecas, se difunde hacia el sur y el norte del Continente Americano, - Hasta que su descubrimiento por los hombres blancos de Europa lo llevan a ese Continente Viejo, y de allí a Asia y a Africa, esparciéndose su uso por todo el mundo para retornar a América. A México tocó, en el siglo XVI, - ser el corredor a través del cual se difundieron en América y el resto del mundo esos tres granos alimenticios, - los tres panes máximos del hombre, que dieron las colosales civilizaciones del trigo, el arroz y el maíz, siendo esta última la nuestra mexicana.

### Evolución del Maíz.

El maíz tal como lo conocemos actualmente, - es el mismo que ha dependido de la mano del hombre para su vivencia, durante milenios; pero es huérfano entre las gramíneas, pues no pertenece a ninguna familia conocida. Ha sido cultivado incesantemente en América, quizá durante los últimos 15 000 años, cinco mil después de que los primeros habitantes de América se establecieron en el Continente, y por hibridación cultivaron al maíz silvestre, llegando a producir el actual en mazorcas, en lugar de espigas con vainas cerradas, como fue el original selvático.

Las excavaciones de los dos últimos decenios, sobre todo en los valles del México meridional, han reconstruido la evolución del maíz con gran detalle. Sabemos, por ejemplo, que el cultivo del maíz se inició hacia el quinto milenio antes de nuestra era, por lo menos 2 000 años después de que se empezó a cultivar el trigo en el Viejo Mundo, y que la mejora de la planta cultivada fue lenta y difícil.

Una razón de la dificultad pudo haber sido la planta con que tuvieron que vérselas los antiguos agricultores. Los primeros zurcos medían menos de dos centímetros de longitud. Tenían unos 50 pequeñísimos granos o menos que un dedal de alimento (una mazorca actual tiene de 500 a 1000 granos relativamente grandes). Los de la planta primitiva estaban fijas flojamente al zurco, y la perfolia se abrían en la madurez, dejando a los granos sin protección (a diferencia de la actual que cubre completamente a la mazorca). Pero, al parecer, las mismas características que hacían poco productivo cultivar la planta, ayudaron a su desarrollo evolutivo. Las semillas desnudas del maíz madura, expuestas a la intemperie, podían ser arrancadas fácilmente y diseminadas por el viento en los nuevos lugares.

En 1949, el geneticista norteamericano profesor Paul C. Mangesdorf realizó un descubrimiento arqueológico de gran importancia para la historia del maíz, al encontrar en una cueva de nuevo México restos acumulados de civilizaciones indígenas, superpuestas en varias capas donde se hallaron, con otros ejemplares de la vida india, mazorcas de maíz; lo que permite seguir las cambiantes características de la planta, logradas por el cultivo, dando fuerza a la opinión que ha estimado que el maíz moderno descende, por hibridación, del original maíz tunicado, o cuyos granos se encontraban separados y encerrados en vainas, en lugar de formar hileras seguidas en la mazorca, como se conoce actualmente.

Por otra parte, el profesor Mangesdorf descubrió que, mediante el método del  $14C$ , los testimonios más antiguos que se conocen del cultivo del maíz están en la zona de dominio del antiguo México, y corresponden a una antigüedad de 5 600 años, mientras que los cul

tivados en otros lugares como los del Perú, por ejemplo, que disputan primacía a los mexicanos, apenas tienen - - una antigüedad de unos 800 años.(1).

### El Maíz Híbrido.

El maíz híbrido, es aquel cuyo cultivo controlado desplaza al que se hacían sin orden alguno. La creación del maíz híbrido, uno de los más grandes adelantos de la historia de la producción de alimentos, se basó en las leyes de la herencia propuestas por el primer genetista, el monje austríaco Gregor Mendel, en 1865. En -- forma moderna, estas leyes afirman que los genes de las plantas y animales, transmitidos de los padres a su descendencia, llevan características específicas. Los genes del maíz, determinan el aspecto, la resistencia a las enfermedades, la temporada de crecimiento, rendimiento, - etc. Normalmente, las plantas de maíz no son uniformes porque en el proceso de la fecundación participan los genes de varias razas. Pero los geneticistas comprendieron que era posible seleccionar y perpetuar características uniformemente buenas si podían lograrse que el maíz se cruzara consigo mismo.

La idea no era tan descabellada como parece. Las plantas de maíz contienen células reproductoras masculinas y femeninas en el mismo tallo: las masculinas - en las panículas, en lo alto del tallo y las femeninas en las barbas que brotan de las mazorcas. Para cruzar al maíz consigo mismo, era necesario encontrar la manera de polinizar las barbas directamente de la panícula de la propia planta. La tarea, llevada a cabo en gran parte - por George Harrison Shull del instituto Carnegie y Edward Murray East de la Estación Agrícola Experimental de - - Connecticut, no era fácil. Había que de encontrar panícu

las y encerrarlas con las barbas en bolsas de papel glas sine para impedir la fecundación por otras plantas. Tenían que polinizar a mano una planta por vez. La creación de una raza pura de maíz (una planta que prácticamente no tuviera variación en las características entre las plantas individuales) requirió de 5 a 8 generaciones "autofecundadas". Y entonces, cuando se habían formado estas razas puras, generalmente mostraron una marcada disminución de vigor y productividad. Después de generación tras generación de inter cruzamiento, las plantas eran pequeñas y débiles.

Y entonces los geneticistas hicieron un descubrimiento extraordinario. Cuando se cruzaba una planta intracruzada pura con una variedad intracruzada diferente, su descendencia, llamada híbrida, era más grande y fuerte que cualquiera de sus progenitores. Un "cruzamiento" de dos linajes puros creaba un maíz híbrido superior a cualquiera de los que existían: un "doble cruzamiento" de dos híbridos era aún mejor. Y como se habían predeterminado cuidadosamente las características de cada linaje, los geneticistas podían crear su maíz híbrido a su antojo seleccionando genes para el contenido proteínico, la resistencia a las enfermedades, la adaptabilidad a determinados suelos y climas y, sobre todo, el rendimiento. Desde el principio la productividad de las nuevas plantas híbridas, sobre todo en suelo abonado, fue electrizante. En casi todos los casos, las plantas experimentales dieron por lo menos el doble de la tasa usual de 2 175 litros por hectárea. (2)

### Tipos de Maíz.

Se reconocen varios tipos generales de granos de maíz. En primer lugar está el llamado maíz palome-

ro, cuyos granos se dilatan y estallan al ser sometidos a la acción del calor, dejando expuesta la parte interior del grano. Este "estallido" se debe al hecho de que el centro del endospermo está formado por células que contienen una proporción inusualmente grande de agua. Las rodea un tejido más duro y seco. Al calentarse, la humedad de las células en el centro del grano se expande o se convierte en vapor, por lo cual se integra la presión que en última instancia hace explotar el grano de tal manera que su parte interior queda expuesta al exterior.

El segundo tipo de maíz es el llamado maíz de harina. En este caso, el "almidón suave" de las células del endospermo forma fácilmente una pasta cuando se le agita en agua. En el maíz de harina el contenido del grano (este es, el fruto de una sola semilla) tiene un color blanquecino, salvo en algunas variedades raras de América Central o de América del Sur, en donde algunos pigmentos adicionales dan a los granos un aspecto rojizo o de otro color.

El tercer tipo de maíz es el maíz duro. En esta variedad toda la parte exterior del grano está compuesta por almidón "duro" (que no forma fácilmente una pasta al ser agitado en el seno del agua), esta composición da al grano una superficie brillante. El maíz duro puede crecer más al norte que cualquiera de las otras variedades, y se sabe que los indígenas que habitaban las porciones nororientales de los Estados Unidos cultivaban un maíz duro de granos angostos a la llegada de los colonizadores europeos.

El maíz dentado es la cuarta clase de maíz. Aquí el almidón "duro" está limitado a las partes laterales del grano. El almidón "suave" forma el núcleo y la

parte superior. El almidón suave se contrae cuando el grano se seca, produciendo el diente apical característica. La característica dentada del grano por lo regular va asociada con una alta productividad, y la mayor parte del maíz producido en la actualidad en el "cinturón de maíz" de los Estados Unidos tiene esta forma de diente. Sin embargo, los indígenas de Virginia y las Carolinas ya cultivaban maíz dentado en los tiempos anteriores a Colón.

Una quinta clase de maíz que se encuentra en la actualidad, es el maíz dulce, en el cual las células del endospermo contienen, en lugar de almidón, una concentración bastante alta de azúcar. El maíz dulce por lo regular se cosecha antes de que madure, cuando el endospermo está todavía en estado líquido; entonces se dedica al consumo humano. Cuando el grano de maíz dulce se seca, asume su aspecto característico oscuro y arrugado.

El último tipo es el maíz ceroso, que es una variedad rara de maíz. Por lo regular el almidón de maíz tiene dos componentes: amilosa y amilopectina. Pero en el maíz ceroso el almidón está formado solamente por amilopectina. El maíz ceroso puede utilizarse como un sustituto de la tapioca, que se hace del contenido de almidón que aparece en las raíces del cazabe tropical (Manihot utilissima). (3)

### Usos Alimenticios del Maíz.

Los productos alimenticios obtenidos del maíz se pueden dividir en dos grupos generales: los obtenidos del maíz seco y los obtenidos del maíz fresco.

Los principales productos del maíz seco se utilizan estando molido y se agrupan en sémola, harina y fécula, cuyos usos primarios se muestran en el cuadro 1.

La industria del maíz fresco molido provee almidón, jarabes y dextrosa para uso alimenticio, además del consumo del maíz fresco como tal. El almidón es usado tal como se obtiene y en varias formas modificadas, por lo menos para nueve diferentes propósitos en los alimentos, como se muestra en el cuadro 2.

El uso del jarabe y dextrosa de maíz se ha incrementado en los últimos años, dicho incremento ha sido el principal factor en el tremendo aumento en el uso del maíz como alimento.

El consumo alimenticio del maíz en el mundo se presenta en la Figura 1. La mitad del mundo consumidor de maíz se encuentra en el Continente Asiático, con cerca de la tercera parte del total consumido en China Africa consume cerca de la cuarta parte del total mundial.

La importancia relativa del maíz en la dieta de las diferentes regiones del mundo se muestra en el cuadro 3. Centro-América y Sud-Africa están muy adelantadas a otras partes del mundo en el consumo "per capita". En Centro-América y México la harina de los granos tratados con álcali es usada en la preparación de productos alimenticios como tortillas y otros productos elaborados con ellas. El maíz también es consumido en forma de tortas planas llamadas arepas y como tamales. Los Kikuyu en Kenya comen el maíz en forma de tortas de masa llamadas posho y como chenga que es un producto parecido al arroz cocido. En la República de Sud-Afri

ca, el maíz se usa para producir dos tipos de bebidas, - una no alcohólica llamada mahewu y una alcohólica tradicional llamada cerveza bantu, ingerida normalmente cuando se encuentra en fermentación activa. (4)

En México el maíz constituye todavía el principal alimento en la dieta, a un nivel de 133 kilos "per capita" anuales (3 a 5). Dentro de los productos tradicionales del maíz se destacan, por tener el consumo más difundido, las tortillas.

A pesar de que el maíz es el principal cereal de consumo en México, este consumo tiende a disminuir en toda la población, pero en forma más lenta en la zona rural. En 1968 el consumo urbano de maíz por persona era de 88.9 Kg/año, en el medio rural el consumo era de 171.6 Kg/año, para 1976 se estima que los niveles se reducirán a 84.0 y 165.4 Kg y en 1982 a 81.5 y 164 Kg de maíz anuales por persona, respectivamente. (5)

Estas cifras incluyen, además del maíz de grano, productos de maíz con un cierto grado de elaboración, como masa, tortillas, harina, hojuelas, fécula, etc. convertidos a términos de grano.

Los factores que determinan el consumo del maíz son: el aumento del ingreso por persona y las preferencias de consumo en los medios urbano y rural por separado.

En el cuadro 4 se muestra la estadística de la producción maicera de México, desde 1925.

Los datos hasta 1965 son definitivos y los de 1970 y 1971 son preliminares.

De 1925 a 1971 (47 años) el incremento en producción es de 7 438 728 toneladas, correspondientes al 377.8%.

El promedio de producción, de 1960 a 1971, es de 7 984 827 toneladas (6).

En los lugares en que el maíz constituye la materia prima de los alimentos, como en México, se encuentra una deficiencia proteica, ya que hay muchas variedades de maíz que no son ricas en proteínas, y sus proteínas son deficientes en los aminoácidos lisina y triptofano. En el pasado estas deficiencias podían ser eliminadas sólo incluyendo a la dieta alimentos ricos en proteínas, los cuales eran productos animales. Ahora es posible "construir" alimentos con requerimientos específicos. Por ejemplo, los productos alimenticios CSM (del inglés - Corn-Soy-Milk) que son mezclas de harinas de maíz y soya adicinadas de sólidos no grasos de leche, con vitaminas y minerales.

Podemos decir entonces, que desde el punto de vista nutricional debe tenerse en cuenta que el maíz no es un suplemento enriquecedor de proteína debido a su concentración (cerca de 10%), pero que resulta útil cuando se consume en productos a base de maíz o cuando suplementa proteínas de calidad inferior y de un nivel similar, como sucede en México, al consumir tortillas (hechas de maíz) con frijoles. La diferencia en la calidad de las proteínas de maíz, tortillas y frijol con los requerimientos de FAO se muestran en el cuadro 5.

Otro avance en el problema de la deficiencia proteica son los estudios de mejoramiento genético del maíz a través del desarrollo de nuevas variedades. En

1969, fue vendido el primer producto alimenticio comercial preparado con el maíz "opaco-2", en Colombia. Este producto, así como un buen número de productos de maíz fortificado proteínicamente, se encuentran con proteínas equivalentes a la proteína de leche, en cuanto a su valor nutritivo.

Si se llegara a desarrollar la raza de maíz "opaco-2" que contenga 15% o más de proteínas, esta raza podría calificarse como un alimento completo para niños.

### El maíz como Alimento para Ganado.

El maíz tiene muchas ventajas como grano de alimentación para animales. Su digestibilidad es relativamente alta; es una buena fuente de energía; es apetitoso para los animales como un constituyente en las mezclas de alimentos balanceados; y es un constituyente alimenticio barato ya que el rendimiento por unidad de área es alto.

La posición del maíz como un grano de alimentación animal varía ampliamente en las diferentes partes del mundo. El consumo del maíz como alimento para animales en América Central y el norte de Sud-Africa varía grandemente de lugar a lugar, con un rango máximo de 43% del consumo total en Panamá. El consumo del grano por animales, en Asia y Africa es generalmente bajo. El maíz no es usado como alimento para ganado en 15 países de Asia, que representan el 22% de la población asiática, ni en 18 países de Africa que son el 19% de los pobladores del Continente.

## Usos Industriales del Maíz.

Los usos industriales del maíz se han incrementado debido a la creciente demanda del almidón. La mayoría de los usos industriales del almidón se encuentran en las industrias de papel y textiles. Después de la Segunda Guerra Mundial, el lugar de la industria textil ha declinado, incrementándose el de la industria papeleras. Otros usos industriales incluyen la aplicación en adhesivos, materiales de construcción, encuadernación, lavandería, explosivos, y otras. El almidón es usado como tal y calentado, modificado y pregelatinizado, o bien como dextrinas, jarabes de maíz y dextrosa.

Existe poca información acerca de la cantidad de productos de maíz seco que se usan en la industria. Aparentemente su utilización se ha incrementado últimamente, como la del almidón.

Las aplicaciones industriales del almidón y harina de maíz están basadas en sus propiedades funcionales tales como viscosidad, formación de películas, propiedades adhesivas, y suspensión de partículas. El crecimiento de las aplicaciones industriales ha sido un resultado de la capacidad de los químicos para adaptar al almidón a problemas y requerimientos específicos de la industria. Estas adaptaciones han sido alterar la organización granular, el tamaño molecular, la estructura o la preparación de derivados químicos. Como ejemplos de los productos comerciales recién preparados de almidón tenemos al almidón hidroxietilado, almidón cetónico, almidón dialdehídico, acetato de almidón, almidón cianoetilado, carboximetil almidón y sulfatos y fosfatos de almidón.

Los xantatos de almidón y productos relacionados se han desarrollado como agentes reforzantes de hu-

les y para la preparación de hules en polvo que pueden ser moldeados o extruidos como los plásticos en polvo.

La dextrosa es una materia prima para gran cantidad de productos industriales, obtenidos por síntesis química o por conversión fermentativa. La goma de xantán es un polisacárido soluble en agua producido comercialmente hace poco, por fermentación de dextrosa. Las propiedades de la goma son tales que se tiende a incorporarla en nuevas áreas que no introducen al almidón mismo.

El maíz es usado con propósitos industriales en 25 países de Europa, Asia y el Hemisferio Oeste. La figura 2 muestra que los Estados Unidos tienen el 65% del total; 17 países de Europa, utilizan el 29%; y el 6% restante es consumido por 7 países de Asia, Centro y Sud-América. La Figura 3 presenta un resumen del consumo total de maíz, con excepción de su uso para siembra y las pérdidas por desperdicio. Esta figura muestra que aunque el maíz fue usado originalmente como alimento, ahora es usado ampliamente como alimento animal. Este grano tan versátil es importante como alimento humano, y su utilización con propósitos industriales está creciendo rápidamente ya que los científicos encuentran nuevos caminos para adaptarlo, a bajo costo en una materia prima fácilmente disponible para llenar necesidades específicas.

## ENZIMAS AMIOLITICAS.

Las enzimas se pueden definir como biocatalizadores, es decir, macromoléculas de origen biológico que tienen la capacidad de acelerar o retardar reacciones

químicas, sin que ellas sufran alteraciones. En la nomenclatura moderna, el nombre aplicado a una enzima específica se designa de tal manera que da algún indicio ya sea del sustrato o de la reacción para la cual la enzima es específica.

A las enzimas que degradan al almidón se les designa como amilasas. Por definición, el término amilólisis debe reservarse para las reacciones en donde se "rompe" o degrada al almidón.

### Clasificación de las Amilasas.

Las amilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de las uniones glucosídicas alfa (1--4) de los polisacaridos del tipo de la amilosa, la amilopectina, el glucógeno y sus productos de degradación. Debido a que los productos finales del rompimiento del almidón son las fuentes usuales del carbono para la célula, no es sorprendente que las amilasas se encuentren distribuidas casi universalmente en animales, vegetales y microorganismos.

Históricamente, las amilasas están clasificadas en dos clases principales, los tipos alfa y beta. Ambos tipos enzimáticos hidrolizan las uniones glucosídicas alfa (1--4); sin embargo, los tipos alfa producen compuestos que tienen una configuración alfa en el carbono 1 del grupo reductor (mutorrotación hacia abajo), y la forma beta da lugar a los productos con configuración beta en el mismo carbono.

Una segunda diferencia también importante entre las formas alfa y beta, que puede o no estar conectada con la liberación de productos con diferente configuración, son los distintos patrones de acción.

Las alfa-amilasas son endo enzimas, o sea - que son enzimas que hidrolizan uniones alfa (1--4) localizadas en las regiones intermedias del sustrato, liberando productos de tamaños variables. Las beta-amilasas son exo enzimas, existe sólo una unión glucosídica en la molécula de almidón, susceptible a la beta-amilasa, esta es la penúltima unión del lado no reductor de las cadenas, - la beta-amilasa ataca de una manera ordenada produciendo beta-maltosa y su acción cesa cuando se acerca a los puntos de ramificación en la amilopectina.

La Comisión Internacional de Enzimas, ha descrito un sistema general para la clasificación de estas enzimas, dividiéndolas en grupos generales. Las amilasas se encuentran dentro del tercer grupo principal, designado como Hidrolasas que actúan sobre los compuestos Glucosídicos.

La clave designada a la alfa-amilasa es 3.2.1.1. y se le denomina sistemáticamente como alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasa. La clave de la beta-amilasa es 3.2.1.2. y se le designa con el nombre sistemático de alfa-1,4-glucan-maltohidrolasa.

Acción de las Amilasas sobre el Almidón.

Como se indicó anteriormente, los componentes del almidón pueden hidrolizarse enzimáticamente, principalmente por dos tipos de enzimas, alfa y beta-amilasas.

Algunos estudios realizados con diversas alfa-amilasas cristalinas, sugieren que los sustratos lineales como la amilosa se degradan completamente a glucosa y maltosa por diversas rutas. Algunas de las alfa-amilasas, como la de saliva humana, completan la hidrólisis más -

eficazmente que otras, como la alfa-amilasa de cebada. - La acción de beta-amilasa sobre la cadena de amilosa, - da lugar a una conversión casi completa a maltosa.

La amilopectina también es hidrolizada por - las alfa y beta-amilasas, dando como resultado polisacáridos con una magnitud de cadena intermedia, denominados dextrinas, además de maltosa.

La alfa amilólisis de la amilopectina da lugar - a una serie de dextrinas alfa-amilasa límite, que contienen uniones alfa (1--4) y alfa (1--6), variando su magnitud desde un pentasacárido a moléculas de mayor peso - molecular, las más grandes pueden contener hasta dos o tres uniones alfa (1--6). La acción de la beta-amilasa - sobre los polimeros ramificados de amilopectina, es también incompleta, debido a que la enzima deja de funcionar cuando se aproxima a la unión alfa (1--6). De las - amilopectinas típicas se obtiene de un 50 a 60% de maltosa, y del glucógeno que es más ramificado, de un 40 a - un 50% de maltosa. El residuo no atacado, es un poli-mero de alto peso molecular, denominado dextrina beta--límite, y contiene todas las uniones de ramificación del - polimero original.

Las alfa (1--6) glucosidasas hidrolizan las - uniones alfa (1--6) en los puntos de ramificación, por lo que la acción combinada de alfa-amilasa son alfa (1-6) - glucosidasa puede degradar completamente a la amilopectina en maltosa y glucosa.

Propiedades Generales de las Amilasas.

Todas las amilasas son inactivadas irreversiblemente con concentraciones altas de ácidos y álcalis, o

con altas temperaturas. Son solubles en agua, en soluciones etanólicas diluidas. En presencia de concentraciones salinas y etanólicas elevadas, precipitan de manera que se pueden volver a activar, cuando se redissuelve en agua.

5. [La actividad de cualquier amilasa depende de un gran número de factores. La velocidad de reacción puede ser influenciada por las sales, productos de rompimiento de proteínas, lípidos, etc., y por otras sustancias clasificadas como activadores o inhibidores específicos. Muchos de los llamados activadores, funcionan ya sea incrementando la solubilidad de la amilasa o aumentando su estabilidad, la acción estabilizadora del calcio es un buen ejemplo, el efecto principal de este ión en la alfa-amilasa es aumentar su estabilidad de una forma tan pronunciada, que la alfa-amilasa de malta de cebada purificada es estable sólo cuando esta presente el ión calcio; sin embargo, existen datos que parecen indicar que ciertas isoenzimas de alfa-amilasa no son dependientes del calcio.]

Todas las amilasas tienen un pH óptimo para su acción, que depende de la duración y la temperatura de la reacción para cualquier amilasa específica. Esta aparente anomalía, resulta de la diferencia existente entre el pH óptimo para la actividad y la estabilidad térmica, por ejemplo, la alfa-amilasa de malta de cebada es más estable a un pH cercano a 7, pero el óptimo para la actividad a 30°C, no esta arriba de 5. Si la temperatura se eleva lo suficiente para causar una inactivación progresiva de la enzima, el pH óptimo aparentemente se elevará gradualmente, en otras palabras, la actividad óptima aparente depende del pH óptimo y del valor del pH y temperatura a las cuales la amilasa tiene su mayor estabilidad, una de las razones de no tener datos exactos, es el hecho de que las distintas formas de enzimas repor

tadas, no han sido caracterizadas por separado.

[ La relación entre la actividad amilolítica y la temperatura es otro factor muy importante, a rangos de temperatura bajos, por ejemplo entre 20 y 30°C, la velocidad de conversión se duplica al elevarse la temperatura en 10°C. A medida que la temperatura aumenta, la velocidad de reacción disminuye hasta que se llega a un punto en el cual ya no cambia aunque aumente la temperatura. - En este punto la velocidad ya no cambia y la pérdida irreversible de amilasa es igual a la actividad de la amilasa restante, un aumento posterior en temperatura causa una mayor disminución de actividad y eventualmente, la disminución y destrucción completa de la enzima. Las amilasas provenientes de diferentes fuentes, tienen grados diferentes de termoestabilidad. ] (7)

Importancia de las Amilasas en la Germinación de Cereales.

El lugar más importante de almacenamiento de almidón está en las semillas, especialmente en los granos de cereales. La digestión del almidón almacenado es más rápida durante la germinación de las semillas y en este caso, hay al parecer, dos procesos principales para la descomposición del almidón en la unidad básica que es la glucosa. Estos dos procesos se muestran en la Figura 4.

En el proceso (1) intervienen enzimas fosforilasas que desdoblan la molécula de almidón introduciendo grupos fosfato a los enlaces glucosídicos.

El proceso (2) ha sido más extensamente estudiado que el (1). Como se indicó anteriormente, la enzima beta-amilasa ataca los extremos no reductores de

las moléculas de almidón separando unidades sucesivas - de maltosa hasta que llega a un punto en que la amilosa - es completamente desdoblada y la amilopectina hasta que - se produce una ramificación en la cadena.

La enzima alfa-amilasa, produce dextrinas - - (polimeros de peso molecular más bajo que el almidón) - rompiendo las moléculas lineales de amilosa, así como - las ramas libres y las porciones entre las ramas de la - amilopectina ramificada.

Mediante su acción dextrinizadora, la alfa-ami - lasa suministra un crecido número de grupos finales no - reductores para el ataque por la beta-amilasa.

De la anterior acción combinada de alfa y be - ta-amilasa, quedan restos (al menos en el laboratorio) - de un cierto número de grupos funcionales llamados "dex - trinas límite", con enlaces alfa (1--6) glucosídicos que - son altamente, si no por completo, resistentes a la rup - tura. No se sabe si estas dextrinas límite se encuentran en las células de la planta durante la digestión del almi - dón.

En cualquiera de los dos procesos de diges - tión, anteriormente expuestos, un producto final es gluco - sa-6-fosfato, que puede usarse en el lugar de la diges - tión para fines metabólicos, o convertirse en glucosa li - bre, para translocación a alguna otra parte de la semilla donde se necesita como sustancia nutritiva. (8)

De lo explicado anteriormente podemos afir - mar que la presencia y actividad normal de las amilasas en la semilla que contiene almidón como nutriente de re - serva como es el caso de los granos de cereales, es de suma importancia para el buen desarrollo de nuevas plan -

tas, y por lo tanto para la distribución de su cultivo.

### Importancia Industrial de las Amilasas.

El uso de las amilasas en la industria parece ser tan antiguo como la civilización misma. Su uso principal se encontró al descubrir un brebaje tóxico proveniente de la fermentación de grano de cereales.

Las fermentaciones, en el sentido popular, -- han sido conocidas desde hace tanto tiempo como tiempo tiene la historia misma. En los jeroglíficos egipcios, -- inscripciones babilónicas y mitología griega se encuentran referencias acerca de la fermentación del jugo de uva. -- El uso de cereales malteados para producir bebidas alcohólicas es también una vieja práctica. Sin embargo, las -- reacciones químicas asociadas con los fenómenos de digestión, putrefacción y fermentación no fueron estudiadas -- sino hasta el principio del siglo XVII cuando algunos famosos químicos como Gay-Lussac, Berzelius, Dubrunfaut, Kuhn y Von Liebig hicieron importantes contribuciones.

Aunque las enzimas se encuentran en forma -- natural en casi todos los materiales alimenticios y los -- cambios causados por la acción enzimática han sido observados y reportados desde el principio de la escritura, -- hasta un tiempo después se reconoció esta acción enzimática. Uno de los avances más importantes en el estudio -- de la acción enzimática ocurrió cuando Kirchoff (1 de 9) -- descubrió que el almidón era convertido en azúcar por la acción de ácido diluido y calor, pero que el ácido sólo -- no entraba en la transformación. Este ejemplo de acción enzimática fue la catálisis que indujo a la investigación -- intensiva de otros fenómenos similares y al conocimiento de las propiedades y condiciones experimentales óptimas -- de los sistemas enzimáticos.

Desde la antigüedad se han conocido muchos tipos de levaduras, hongos y bacterias que producen cambios en las operaciones de la vida cotidiana o las industriales, como son la producción de vinos, cerveza, quesos y en la fermentación de la masa del pan. Con suficientes conocimientos se puede saber el control de operación de estos procesos, las bases nos pueden conducir a la industrialización y producción comercial de enzimas microbiológicas.

En 1830, Dubrunfaut (2 de 9), encontró que un extracto de malta convertía el almidón en azúcar, y poco después, Payen y Persoz (3 de 9) precipitaron el material activo por medio de alcohol y encontraron que permanecía activo después de seco. El producto fue llamado diastasa.

Al tiempo que el químico de enzimas y de la acción enzimática, desarrolló sus conocimientos, los usos industriales también se desarrollaron, pero sucesivamente la producción de enzimas se convirtió en una larga y tediosa tarea. El desarrollo de alfa-amilasa a partir de granos de malta y la separación de amilasas y proteasas de las glándulas pancreáticas fueron ya prácticas comunes. Se sabe que las amilasas de los granos maltados difieren de las amilasas obtenidas del páncreas de los animales, así como también se ha reconocido el hecho de que hongos y bacterias bajo condiciones apropiadas producen una variedad de enzimas; por lo tanto, fue un incentivo el producir enzimas con variedades comerciales.

La gran variedad de usos de las enzimas proteolíticas, en la industria del curtido de pieles y del uso de las amilasas, dió como resultado una considerable in-

versión de tiempo y recursos en el desarrollo de enzimas bacterianas. Boidin y Effront (6 y 7 de 9), Wallerstejn (8 de 9), Smythe (9 de 9), Weith (10 de 9), Shellenberger (11 de 9) y Birkinshaw et al. (12 de 9) han descrito la producción comercial de enzimas a partir de bacterias y hongos.

Las enzimas han sido obtenidas comercialmente de hongos, bacterias y tejidos animales. Las enzimas también han sido sintetizadas (13 de 9). Por ejemplo, la amilasa es preparada a partir de la acción de hongos, bacterias, granos malteados y por separación de glándulas pancreáticas de animales. Cada producto tiene propiedades especiales que las diferencian de otros productos. el cuadro 6 ilustra las diferencias en propiedades de cuatro diferentes amilasas.

En el cuadro 6 los cuatro orígenes de las amilasas fueron acomodados en orden de estabilidad térmica creciente. Bajo las condiciones del experimento, se muestra la relación de actividad de alfa y beta-amilasa sobre almidón de cassava, cuando la acción licuefaciente es medida por determinación de la viscosidad y la acción sacarificante por la producción de azúcares reductores.

No se encontró relación de las actividades de alfa y beta-amilasa, en las condiciones de experimentación para las amilasas pancreáticas, debido a que la acción enzimática cesa después de que ocurre la gelatinización del almidón. La amilasa pancreática es inactivada a una temperatura relativamente baja; las amilasas bacterianas permanecen activas a más altas temperaturas. Las amilasas fúngica y de malta son intermedias. Estas diferencias son importantes en las aplicaciones industriales de las amilasas.

La fermentación y la producción de pan tienen una larga historia, por esta razón, los conocimientos acerca de las variantes en las funciones de la alfa-amilasa fueron estudiadas en panadería durante la promoción de la producción de gas durante la fermentación de la masa, así como la acción de enzimas diferentes a las de los granos malteados. La producción de amilasas de hongos fue primeramente conseguida en el Oriente. Aparentemente el primer uso de las enzimas de hongos en panadería fue hecho en Japón con resultados bastante adversos ya que la masa en fermentación fue inoculada con esporas que produjeron viscosidad en el pan cuando se agregó el producto enzimático. Las primeras preparaciones enzimáticas de hongos fueron producidas por crecimiento de Aspergillus oryzae principalmente, sobre salvado humedecido, secando el producto y distribuyéndolo de esa manera. Después de los desalentadores logros originales, pasaron muchos años para que las enzimas de hongos y bacterias fueran usadas en la industria panificadora.

La primera introducción alagüeña de las enzimas, que no fueran de trigo malteado o harina de cebada, se llevo a cabo en 1936. El método estandar para obtener a estas enzimas (amilasas y proteasas principalmente) fue precipitándolas con solventes orgánicos, a partir del medio en que se hacían crecer a los hongos y bacterias.

En algunos laboratorios de investigación de cereales asociados con molinos de trigo y panificadoras, se ha encontrado que algunas preparaciones de amilasas producían gas en períodos de hasta 6 horas, medido por el Método del Presurómetro (14 de 9), ajustando las condiciones del medio. El resultado de reportes recientes muestran que las preparaciones de alfa-amilasa de harina de trigo malteado y la de hongos resultaron completamen

te aceptables para la producción de pan; la alfa-amilasa de bacterias era indeseable, pero podía usarse; y la alfa-amilasa de glándulas pancreáticas era completamente no-satisfactoria.

Las propiedades de las enzimas producidas comercialmente difieren no sólo por la fuente de obtención, sino que también por el tipo de microorganismo empleado, el medio nutritivo y las condiciones ambientales; por estas razones se requiere investigación para determinar los aspectos que involucran el uso de las enzimas en la panificación y otras industrias.

En la Universidad de Nebraska, M.J. Blish, R.M. Sandsted, y E. Kneen, investigan activamente la relación de las amilasas y proteasas en la panificación (15 de 9). Estas relaciones han sido estudiadas y discutidas desde 1908 por Ford y Guthrie (16 de 9). En 1946 se realizó una excelente revisión de la aplicación de las amilasas y proteasas en la industria de la panificación. Dicha revisión se encuentra en el libro "Las Enzimas y su papel en la Tecnología del Trigo" (15 de 9).

En estudios más recientes conducidos por Miller et al. (17 de 9) en la Universidad del Estado de Kansas, se han incorporado nuevos conocimientos acerca de la acción de amilasas y proteasas de hongos en la panificación. Ellos comparan la acción de alfa-amilasa de cereales, hongos y bacterias como suplementos en la panificación. (18 de 9).

Otra de las aplicaciones industriales de las amilasas es en la industria de la fermentación de granos, en que se utilizan para obtener los azúcares fermentables a partir de almidón de los granos. Tal es el caso de la

industria Cervecera, en que se utilizan los granos de cebada, arroz y maíz para obtener dichos azúcares fermentables por las levaduras adecuadas. El almidón que se encuentra en estos granos debe ser hidrolizado previamente, para lo que se utilizan las amilasas de la cebada maltada.

La industria textil emplea amilasas obtenidas de bacterias, de la malta de cebada, de los hongos y del páncreas, como agentes para quitar el apresto. Se agrega almidón para dar textura y tersura (apresto) a la fibra de algodón antes de tejerla. El almidón debe quitarse antes de teñir la tela lo que se consigue con una preparación a base de amilasa.

#### INHIBIDORES ENZIMATICOS. /

Se sabe que la función de una enzima puede ser impedida si cualquiera de los grupos requeridos para el acoplamiento o para la catálisis no está disponible para la interacción con el sustrato. Existen algunos inhibidores de enzimas que tienen una gran afinidad por ellas, y al ser moléculas grandes bloquean en parte, sino todo, el sitio activo. Estos inhibidores son generalmente de naturaleza peptídica, aunque existen otros inhibidores no proteícos.

Se debe entender como inhibidor a compuestos o materiales que tienen el efecto de retardar o paralizar una reacción química. Dicho efecto producido por estos compuestos es llamado inhibición, la cual puede ser de diversos tipos.

En el sentido usual, los inhibidores producen una acción química definida, que puede ser reversible o

irreversible. La palabra reversible, sin embargo, ha sido usada en dos diferentes sentidos. En el primero se implica que la actividad se recupera con solo eliminar al inhibidor por dialisis u otros métodos, mostrando que hay un equilibrio entre el inhibidor libre y la enzima. En contraste, cuando un inhibidor irreversible es eliminado, la actividad no retorna con la dialisis. La palabra reversible también ha sido aplicada en otro sentido, en el caso de la posibilidad de eliminar al grupo que inhibe a la enzima por una reacción química, aunque no se disocie espontáneamente. La irreversibilidad en este sentido denota que todos los intentos de eliminar al grupo por medios químicos son infructuosos aunque esta posibilidad no debe de excluir que la inhibición se convierta en reversible como resultado de futuras investigaciones. Se suele usar el término de "reactivación, mejor que "reversión" en los casos en que se separa al grupo inhibidor.

La inhibición reversible esta caracterizada -- por un equilibrio entre la enzima y el inhibidor, definida por una constante de equilibrio que es una medida de la afinidad. La efectividad de la inhibición normalmente se expresa por su constante  $K_i$ , que es el recíproco de la afinidad enzima-inhibidor.

La inhibición irreversible, por otro lado, esta caracterizada por un incremento progresivo con el tiempo, estableciendo la completa inhibición aún en soluciones diluidas del inhibidor. La efectividad del inhibidor esta expresada por una constante de velocidad y no por una -- constante de equilibrio. La constante de velocidad determina la fracción de la enzima inhibida en un período de tiempo dado, bajo una cierta concentración de inhibidor.

Asi como con otros factores se influencia la -- velocidad de las reacciones enzimáticas, los inhibidores --

reversibles pueden actuar indistintamente sobre la  $K_m$  -- aparente o la  $V$ ; cuando la  $K_m$  se incrementa por el efecto, es llamado "inhibidor competitivo", debido a que el inhibidor y el sustrato tienden a moverse hacia la enzima, de tal manera que el inhibidor compite con el sustrato por la enzima; cuando no tiene efecto sobre la  $K_m$ , pero actúa simplemente por la reducción de  $V$ , es llamado "no competitivo". El efecto de un inhibidor competitivo es suprimido con grandes concentraciones de sustrato, lo que indica que  $V$  no es afectada; en un inhibidor no competitivo aunque aumente el sustrato no se suprime el efecto.

Un tipo de efecto competitivo también puede ser observado con inhibidores irreversibles, en éstos el sustrato puede proteger a la enzima del inhibidor por una reducción de la constante de velocidad de la inhibición. Este efecto competitivo ocurre cuando el inhibidor se combina con el sitio activo en el grupo de unión con el sustrato.

Las sustancias, especialmente las que tienen estructuras semejantes al sustrato, cuando se combinan con la enzima en el mismo sitio que el sustrato producen una inhibición de tipo competitivo (Tipo I), las sustancias que se combinan en otro lugar, suficientemente lejos del sitio de unión del sustrato y que no tienen influencia en la unión del sustrato, producen un tipo no competitivo de inhibición (Tipo II).

En el tipo no competitivo la enzima puede combinarse con el inhibidor y al sustrato al mismo tiempo; en el tipo competitivo este puede o no ser el caso. Si el inhibidor y el sustrato se combinan en el mismo sitio (Tipo Ia), la enzima puede combinarse con cualquiera, pero no con los dos. También es posible, que el inhibidor

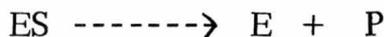
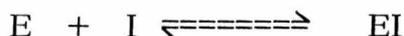
no se convine en el sitio de unión con el sustrato sino en otro sitio, lo suficientemente cercano como para producir una reducción en la afinidad de la enzima por el sustrato (Tipo Ib). Esto también produce efectos competitivos, aunque la enzima pueda combinarse con sustrato e inhibidor al mismo tiempo. El complejo EIS, cuando se forma, se rompe a la misma velocidad que el complejo ES en este tipo de sistema.

En el tipo Ia la combinación con el inhibidor elimina completamente la posibilidad de combinarse con el sustrato; en el tipo Ib el efecto es solo parcial, consistente en una reducción de la afinidad por el sustrato. Puede hacerse una división similar de los efectos completo y parcial en el tipo de inhibidores II, que afectan  $V$ ; en el tipo IIa el complejo EIS no se rompe del todo, mientras que en el tipo IIb se rompe, pero a una velocidad reducida. Existen entonces cuatro casos típicos. Otra posibilidad, ha recibido el nombre de "inhibición incompetitiva" ha sido aplicada o sugerida (667 de 10), cuando el inhibidor puede combinarse solo con el complejo ES. Este tipo de inhibición es muy rara.

También existe la posibilidad de que un inhibidor pueda actuar en más de una forma, dando tipos mixtos; el hecho de que se incremente  $K_m$  no excluye que ocurra un cambio en  $V$  y viceversa.

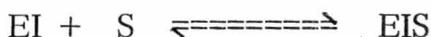
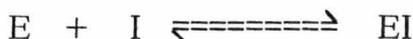
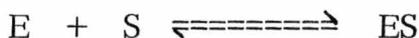
### Inhibidores Competitivos.

Tipo Ia. Su comportamiento es completamente competitivo, el inhibidor se combina en el sitio de unión con el sustrato, este sistema puede representarse por las siguientes reacciones (1815 de 10):



Se asume que el complejo EI no da como resultado ningún producto y que no se puede formar el complejo EIS.

Tipo Ib. - Es el tipo competitivo parcial, el sistema es afectado por el inhibidor disminuyendo la afinidad de la enzima por el sustrato, sin embargo, el inhibidor y el sustrato se combinan con diferentes grupos en la enzima. Para este sistema se pueden escribir las siguientes ecuaciones, con la diferencia que el complejo EIS si puede existir:

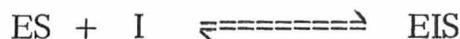
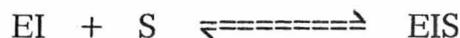
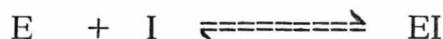
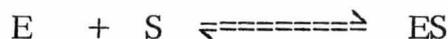


Aquí se asume que la inhibición es puramente el efecto de afinidad, y que los complejos ES y EIS se rompen a la misma velocidad.

## Inhibidores No Competitivos.

Tipo II. - En este tipo de inhibición, el inhibidor no afecta a la combinación del sustrato con la enzima, pero afecta la V. Existen dos posibilidades; en la primera el complejo EIS no puede romperse del todo (Tipo IIa) y la velocidad esta dada únicamente por el rompimiento de ES, el efecto del inhibidor equivale a una reducción de la cantidad de enzima activa; en la segunda, EIS puede romperse a una velocidad diferente a ES (Tipo IIb) y la velocidad es la suma de las velocidades de descomposición de las dos reacciones.

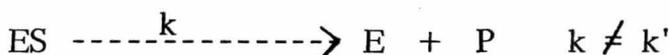
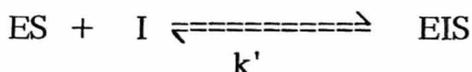
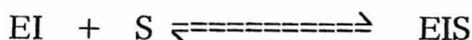
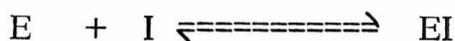
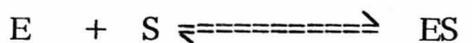
Tipo IIa. - Las ecuaciones para este tipo son:



Para la combinación de cada sustancia no afecta la afinidad con la otra.

La velocidad esta dada por la constante K.

Tipo IIb. - Las ecuaciones para este tipo son:



La velocidad esta dada por la suma de las constantes  $k$  y  $k'$ .

Inhibidores "Mixtos".

Como se mencionó anteriormente, un inhibidor puede actuar sobre  $V$  y  $K_m$ , dando una mezcla de efectos competitivo y no competitivo. Se pueden tener combinaciones de los tipos Ib-IIa ó Ib-IIb; pero no es posible tener la con cualquiera de los tipos II ya que la inhibición-completamente no permite la formación del complejo EIS.

Representación Gráfica de los Efectos Inhibitorios.

El efecto de la inhibición, de varios tipos, se muestra en la Figura 5; la flecha señala la dirección en la cual la gráfica es desplazada en presencia del inhibidor. Los tipos a y b están representados en la misma figura, ya que la dirección del desplazamiento es la misma en ambos casos, pero en los tipos b el desplazamiento se realiza en un límite finito cuando la concentración del inhibidor se incrementa, lo cual no sucede en los tipos a.

El método gráfico de Lineweaver-Burk, el cual se muestra, ha sido particularmente usado para distinguir los tipos de inhibición. Cuando la inhibición es competitiva, las líneas se cruzan en el eje vertical, cuando es no competitivo se cruzan en la línea base y cuando es tipo mezclado el punto de intersección se encuentra entre los dos ejes.

### Otros Tipos Inhibición.

Todos los casos de inhibición que se han tratado involucran una combinación directa del inhibidor con la enzima, pero la inhibición también puede ser producida por una sustancia que se combine con el sustrato, la coenzima o el metal activador y de esta manera la enzima permanece sin cambio. En estos casos la inhibición solo puede ser producida si la concentración de la sustancia inhibidora es del mismo orden que la del sustrato o cofactor afectado, y la adición de más sustrato o cofactor puede eliminar la inhibición (10).

### Posibles Implicaciones Metabólicas de los Inhibidores.

La presencia de inhibidores enzimáticos en los tejidos, principalmente vegetales, ha sido el punto de partida para numerosos estudios sobre los posibles efectos fisiológicos que estas sustancias puedan tener. En todos los casos se encuentran, entre otros, efectos o implicaciones de regulación y protección.

En el caso de semillas, el efecto regulador asegura el buen funcionamiento de todos los complejos enzimáticos al ser requeridos para iniciar la germinación, y el crecimiento de una nueva planta.

La función más intrigante y compleja, pero quizá la de mayor uso potencial, es como protección de la planta. La relación entre las plantas y los insectos y entre las plantas y los microorganismos es muy compleja, pero la multiplicidad de enzimas e inhibidores complica aún más el panorama. Recientemente se ha descubierto que cuando un insecto ataca a una hoja de la planta se induce la producción de ciertos inhibidores enzimáticos que se acumulan en toda la planta, presentando un nuevo concepto de posible inducción de inmunidad hacia pestes y posiblemente contra algunos microorganismos patógenos. Según datos acumulados, el papel de los inhibidores enzimáticos en plantas no es pasivo.

La presencia de inhibidores enzimáticos en las plantas que los insectos utilizan como alimento, puede esperarse que tenga efectos significativos en la nutrición de estos insectos. Si estas plagas continúan ingiriendo los alimentos que contienen al inhibidor, su organismo puede tener serios problemas: no podrán almacenar aminoácidos, si se trata de inhibidores de proteasas; o no tendrán suficiente energía a partir de almidón si se trata de inhibidores de enzimas amilolíticas. Debido a estos problemas el organismo puede morir. Desde este punto de vista, los inhibidores enzimáticos pueden tener gran valor en los tejidos de las plantas como material protector de las proteínas o almidón de reserva (11).

#### ESTUDIO DE FACTORES ANTIAMILOLITICOS EN ALIMENTOS.

El estudio de inhibidores de la actividad amilolítica ha sido reportado desde 1943, cuando Kneen y Sandsted (12) comunicaron la presencia de una sustancia

que impedía la acción de amilasa salival sobre granulos- de almidón nativos del trigo. Esta sustancia era parecida a una proteína y tenía una acción poderosamente inhibitoria sobre la amilasa salival, la amilasa pancreática y sobre algunas amilasas bacterianas, sin embargo, no encontraron inhibición al tratar dos preparaciones de amilasas supuestamente de origen bacteriano, algunas amilasas de hongos y amilasas de cereales malteados. La sensibilidad de las amilasas afectadas variaban en su respuesta, llegando a inhibir el 82% de la velocidad de dextrinización de la amilasa salival, el 48% de la amilasa bacteriana y el 23% de la amilasa pancreática.

La sustancia inhibitoria era soluble en agua, en soluciones diluidas de sales y soluciones de alcohol, pero insoluble en eter de petróleo. Este factor era precipitado con grandes cantidades de sulfato de amonio y con altas concentraciones de etanol. El precipitado, al ser redissuelto en agua, resultaba nuevamente activo. La sustancia era retenida por membranas de dialisis, siendo altamente termoestable en soluciones acuosas, conservó su actividad a temperaturas superiores a 90° C, pero era inactivada completamente al ser tratada en autoclave por 30 minutos a 15 libras de presión.

Este inhibidor fue encontrado en todas las muestras de trigo y centeno estudiadas. También encontraron un factor similar en algunas variedades de sorgo y no pudieron detectar inhibidores de amilasas en cebada, avena, maíz, arroz y en otros sorgos.

En octubre de 1943, Bowman (13), reporta que durante experimentos relacionados con la digestibilidad de frijol observó que el aceite de dicho frijol retardaba la digestión del almidón soluble. Dicha digestión era llevada a cabo por amilasa pancreática. El grado de acción

aparente era lo suficientemente grande como para garantizar el estudio y comparación detallada de esta acción con la que podrían tener otras grasas.

Encontró que la influencia retardante del aceite de frijol era exageradamente grande en comparación con la que tenían la manteca, el aceite de oliva y la mantequilla.

El efecto inhibitorio encontrado era fuertemente eliminado por tratamiento del aceite con levaduras y calentando la preparación a 100°C durante 30 minutos. El calentamiento de los frijoles con ácido diluido y la subsecuente neutralización prevenía la incompleta digestión del almidón.

También en octubre, pero de 1945, Bowman (14), encontró que un extracto acuoso del frijol que estudiaba contenía una fracción sensible al calor que retardaba la acción de la amilasa pancreática sobre almidón soluble. Esta acción inhibitoria se hacía más marcada en pH ácido.

Esta fracción se logró precipitar con alcohol encontrando que se mantenía activa aún precipitándola varias veces con el mismo solvente. La actividad antiamilolítica decrecía marcadamente por calentamiento o por tratamiento con Kaolin. La preparación mostraba actividad antitriptica, también.

Después de su comunicación, en 1946, Kneen y Sandstedt (15) se dedicaron a estudiar la distribución y propiedades generales del inhibidor de amilasas encontrado en trigo y centeno. Reportaron la presencia de un inhibidor de amilasas salival y pancreática, localizándolo en el endospermo del trigo maduro. Estudiaron la presen--

cia del inhibidor en diferentes estadios de la maduración del grano y nunca lo encuentran en etapas inmaduras. -- Aparentemente aparece cerca del estadio que coincide con la obtención del aspecto maduro, o muy cerca de éste, -- presentándose 15 días después de la floración.

Estos autores determinaron la presencia del -- inhibidor al hacer crecer el grano, encontrando que cuando tenía retoños de 12 a 14 mm aún conservaba su actividad inhibitoria sobre amilasas bacterianas, llegando a inhibir el 78.5% de la actividad amilolítica. El hecho de -- que se mantenga la actividad inhibitoria y no varíe en -- concentración durante la germinación puede tener grandes implicaciones metabólicas.

Entre las propiedades del inhibidor que encontraron se encuentran: resistencia a la inactivación por -- temperaturas altas, incluyendo ebullición, el inhibidor -- conservó completa actividad al ser calentado a 70°C por 2 horas, pero se inactivó completamente al calentarse a 121°C por 30 minutos; el inhibidor no atravesó membranas de dialisis; fue estable a la dialisis por 2 días con -- agua destilada o de la llave; dicho inhibidor fue muy soluble en agua destilada y en soluciones muy diluidas de sales, fue altamente insoluble en soluciones concentradas -- de sulfato de amonio, en eter de petróleo, eter etílico y etanol al 95%.

También en 1946, Militzer, Ikeda y Kneen (16) reportaron la preparación, purificación y propiedades del inhibidor de amilasas encontrado en trigo. La preparación y purificación fue realizada por precipitación fraccionada con etanol y siguiente adsorción en óxido de aluminio a pH 5.0, eluyendo a pH 7.5.

Probaron la inactivación con ácido nitroso, - - encontrando que era inactivado completamente en condiciones tales que la temperatura y el pH no tenían efectos. - El ácido nitroso es un reactivo específico que remueve - los grupos amino de las moléculas de proteína y fue usado con este propósito.

También se trató al inhibidor con fisina y se encontró que era destruido. Estas pruebas aunadas con la capacidad de no cruzar membranas de dialisis y la - - precipitación con solventes, los condujeron a afirmar que el inhibidor era una proteína.

La dialisis de soluciones del inhibidor purificado, al realizarse contra agua destilada, daba como resultado la completa inactivación, pero cuando era realizada contra agua corriente, solución de cloruro de sodio o buffer de fosfatos, no ocurría dicha inactivación.

Las pruebas de estabilidad al calor y pH indicaron que a pH alcalino la desnaturalización del inhibidor se realizaba con mayor rapidez, así, a pH 9.0 la desnaturalización requería una temperatura de 95°C mantenida por sólo 10 minutos, en tanto que para pH 5.3 la inactivación se realizaba sometiendo al inhibidor a una temperatura de 97-98°C durante 60 minutos.

El inhibidor fue inactivado con sulfito de sodio, sulfuro de hidrógeno y ácido ascórbico.

Algunos oxidantes como cloro, bromo, clorito de sodio y peróxido de hidrógeno causaban la destrucción rápida del inhibidor. La velocidad de destrucción por oxidantes era mayor que la producida por los reductores antes mencionados.

En otro reporte de Militzer, Ikeda y Kneen (17), también en 1946, tratan el modo de acción del inhibidor de alfa-amilasa encontrando en el trigo y concluyen que:

La afectividad del inhibidor de amilasas obtenido del trigo se incrementa al encontrarse en solución.

Al estudiar su cinética de acción encuentran un tipo de inhibición no-competitiva, lo que ayuda a explicar las anomalías de no inhibir todo tipo de amilasas. Si el inhibidor bloqueara el sitio activo de la enzima, como en una inhibición competitiva, todas las amilasas deberían ser afectadas, pero ya que la inhibición es no-competitiva se implica que algunas amilasas tienen grupos que pueden combinarse con el inhibidor y otras no.

Al determinar los grupos reactivos del inhibidor, no encuentran grupos sulfidrilos, ni tirosina, pero si encuentran grupos amino y una gran respuesta a las pruebas de triptofano, además, los tratamientos químicos específicos para este aminoácido afectan la actividad del inhibidor, por lo que concluye que en el sitio activo del inhibidor se encuentran residuos de triptofano.

No se tiene información de que en los siguientes 18 años se reportaran más trabajos relacionados con estos inhibidores de amilasas, hasta 1964 en que Applebaun (18), estudia el efecto "in vivo" del inhibidor de amilasa encontrado en trigo. Este estudio lo realiza analizando la digestión del almidón por la larva de Tenebrio molitor L. que es un insecto que ataca normalmente al trigo y sus productos. La amilasa de esta larva es una alfa-amilasa típica, basándose en su acción sobre amilopectina, glicógeno y dextrina beta-límite.

Este autor analiza tres dietas básicas para medir el desarrollo de este insecto, la primera sólo contenía almidón de arroz, gluten, levadura seca y colesterol. La segunda dieta contenía además al inhibidor de alfa-amilasa y la tercera contenía un extracto del trigo que contenía al inhibidor de alfa-amilasa y las amilasas propias del grano. La segunda dieta, o sea, la que contenía al inhibidor de alfa-amilasa, provocó la mayor mortandad de los insectos, además de que los que sobrevivían tenían un peso que equivalía a la mitad del que tenían las larvas de la dieta A (sin trigo) y era la séptima parte del de las larvas sometidas a la tercera dieta. El desarrollo incompleto de las larvas alimentadas con la dieta B (con el inhibidor solo) no puede atribuirse a un impedimento, ya todos los factores presentes en esta dieta también lo estaban en la dieta C. Las larvas fueron capaces de utilizar sus propios componentes enzimáticos en la digestión-amilolítica de las dietas artificiales al estar libres de la actividad inhibitoria (dieta A). El gran incremento en el desarrollo de las larvas en presencia de las amilasas del grano puede deberse a que la digestión del almidón por las larvas no es muy eficiente.

Además del estudio de Applebaum en el fenómeno inhibitorio de la digestibilidad del almidón y de los tipos de amilasas de la larva de Tenobrio molitor L., en 1965, Applebaum y Konijn (19), estudiaron la utilización del almidón por la larva de otro insecto que también ataca al trigo: Tribolium castaneum, y al analizar el efecto de varios activadores e inhibidores de la actividad amilolítica de esta larva, encontraron que el resultado más concluyente en la caracterización de la amilasa de Tribolium como alfa-amilasa fue la inhibición producida por el inhibidor de alfa-amilasa encontrado en trigo, ya que este inhibidor no tiene ningún efecto sobre beta-amilasa.

La inhibición que produjo una solución al 0.25% del inhibidor fue de 93% de la actividad amilolítica inicial de la larva del insecto.

En 1968, dos investigadores sudamericanos, Jaffé y Lette (20), estudiaron la presencia de algunos factores termolabiles que inhibían el crecimiento de ratas, presentes en algunos tipos de frijol. Estos autores dijeron que el inhibidor de amilasas observado por Bowman no había sido atractivo para su investigación ya que no se le había dado el valor antinutricional que le correspondía. La acción de este factor o factores había sido observada solo en experimentos "in vitro", pero al alimentar a algunas ratas con frijoles conteniendo un alto contenido del inhibidor de amilasas observaron algunos desordenes, como la presencia de almidon en las heces de estos animales. Las ratas alimentadas con glucosa en vez del almidón no presentaron este problema. El papel del inhibidor de amilasas como factor importante puede explicar el efecto antinutricional que observaron en sus experimentos.

En 1969, Liener (21), realizó una revisión de artículos más importantes hasta entonces publicados, en los que se estudiaba la presencia de inhibidores de la actividad amilolítica. Además de algunos ya mencionados, estudia lo publicado por Miller y Kneen, que en 1947 estudiaron la presencia de un inhibidor de amilasas en sorgo, este inhibidor, en contraste con lo encontrado anteriormente en trigo y centeno, era dializable y estable al calor. Strumeyer y Malin, en 1967 continuaron estudiando a este inhibidor presente en sorgo encontrando que la naturaleza química de la sustancia inhibitoria era la de un polifenol que contenía carbohidratos, con un peso molecular de cerca de 5 000 D.

También en 1967, Rao et al., investigadores - indues, estudiaron la presencia de un inhibidor de amilasas en la raíz de taro (Colocasia esculenta), pero no le dan importancia fisiológica.

Las investigadoras israelitas Ruth Shainkin y - Yehudith Birk, en 1970 (22), aislaron y caracterizaron dos proteínas que inhibían la actividad amilolítica. Estos inhibidores fueron llamados AmI<sub>1</sub> y AmI<sub>2</sub>.

Las dos proteínas fueron aisladas por fracciónación con sulfato de amonio a partir de un extracto acuoso de los granos de trigo. La fracción activa precipitada fue sometida a cromatografía en DEAE-Celulosa y en CM-Celulosa. Al caracterizar a las proteínas encontraron que eran proteínas básicas con pesos moleculares de 18 215 y 26 200 D. La pureza y homogeneidad de las proteínas fue establecida por ultracentrifugación y electroforesis en papel, acetato de celulosa y en geles de poliacrilamida. Encontraron marcadas diferencias en el contenido de aminoácidos, además de una especificidad y afinidad hacia alfa-amilasas de diferentes orígenes. De todas las amilasas estudiadas, AmI<sub>1</sub> sólo inhibió a la de la larva de Tenobrio molitor L. AmI<sub>2</sub> además de inhibir a la amilasa de tenebrio, también inhibió las amilasas salival y pancreática humanas.

El inhibidor AmI<sub>1</sub> fue más resistente a altas temperaturas que AmI<sub>2</sub>. Ambos inhibidores fueron inactivados por digestión con pepsina y pronasa, pero no fueron afectados por carboxipeptidasa o por tratamiento con ácido clorhídrico 0.02 M. El inhibidor AmI<sub>1</sub> perdió su actividad al ser sometido a la digestión con tripsina y quimotripsina, mientras que AmI<sub>2</sub> apenas si fue afectado por estas enzimas. Ambos inhibidores fueron inactivados

por reducción con mercaptoetanol, pero no perdieron su actividad cuando fueron tratados con 6.4M de urea. Las modificaciones químicas como esterificación y carboxilación selectiva causaron un gran deterioro en la actividad inhibitoria de AmI<sub>2</sub> al tratar de inhibir las amilasas de Tenebrio y la salival. Los tratamientos cortos con bromuro de cianógeno produjeron una inactivación idéntica en la actividad inhibitoria de ambas proteínas. Los dos inhibidores fueron inactivados por tratamiento con fluorodinitrobenzenceno y con ácido nitroso, pero no fueron afectados por carbamidación.

La inhibición de alfa-amilasa salival por el inhibidor AmI<sub>2</sub> dependió en gran parte del orden en que eran agregados los reactivos, siendo la inhibición más efectiva cuando se preincubaban juntos la enzima y el inhibidor. Sin embargo, en el caso de la amilasa de Tenebrio no encontraron este fenómeno al tratarlo con los dos inhibidores. La inhibición de la amilasa salival disminuye al preincubar al inhibidor con el sustrato, lo cual se atribuyó a la capacidad del inhibidor AmI<sub>2</sub> para formar complejos con los polisacáridos, teniendo como resultado el bloqueo del sitio de unión del inhibidor con la amilasa salival. Este hecho sugirió que AmI<sub>2</sub> está compuesto básicamente de AmI<sub>1</sub>, el cual contiene el sitio de unión con la amilasa de Tenebrio, pero también posee otro fragmento protéico con sitios de unión adicionales para alfa-amilasa salival y el sustrato.

Tres años después, en 1973, Saunders y Lang (23), estudiaron la purificación y propiedades fisicoquímicas de varios inhibidores de amilasas presentes en trigo. Por medio de cromatografía en DEAE-Sefadex lograron resolver dos inhibidores de alfa-amilasa partiendo de un extracto acuoso de harina de trigo. Las proteínas encontradas fueron nombradas inhibidor de alfa-amilasa I y II.

El inhibidor I se encontró en mayor cantidad y con mayor actividad, fue homogéneo por electroforesis en disco, se midió su peso molecular encontrándose que fue de 20 000 D, y un punto isoeléctrico de 6.7. El segundo inhibidor (II) tenía dos contaminantes menores cuando fue analizado por electroforesis, su peso molecular fue de 21 000 y su pI de 6.5.

Las proteínas encontradas fueron caracterizadas como albúminas típicas. Al observar una proteína al buminoidea aislada anteriormente se encontró un tercer inhibidor de alfa-amilasa. Esta proteína sólo se encuentra en variedades de Triticum aestivum y fue capaz de inhibir alfa-amilasa pancreática. Esta proteína inhibidor fue llamada 0.19 por los investigadores que la aislaron primero como una simple albumina componente del trigo. Los tres inhibidores pueden ser distinguidos por sus movilidades electroforéticas características.

Los tres inhibidores presentaron cinéticas inhibitorias reversibles, lineales y no-competitivas, al actuar sobre alfa-amilasa pancreática de pollo.

Este reporte fue la primera evidencia de que existen múltiples normas de proteínas de trigo capaces de inhibir alfa-amilasas de mamíferos.

También en 1973, unos investigadores italianos comenzaron a estudiar a los inhibidores de alfa-amilasa presentes en trigo, y así, Silano, Pocchiari y Kasarda (24) en ese año, reportan la caracterización física de los inhibidores de alfa-amilasa encontrados en trigo. Ellos encontraron seis albúminas del grano de trigo (hexaploide), designadas 0.19, 0.28, 0.32, 0.35, 0.39 y 0.48 de acuerdo con sus movilidades electroforéticas. Las caracterizaron de acuerdo con su peso molecular, su espec

tro de fluorescencia, su composición de aminoácidos y su especificidad de inhibir alfa-amilasas de saliva humana, - pancreas de pollo, del insecto Tenebrio molitor L., la bacteria Bacillus subtilis y el hongo Aspergillus oryzae.

Las proteínas 0.19 y 0.28 resultaron ser similares a las descritas anteriormente (Shankun & Birk y - - Saunders & Lang.) Las proteínas 0.28, 0.32, 0.35, 0.39 y 0.48 fueron reunidas en una sólo familia, ya que resultaron estar muy relacionadas entre sí, todas inhibieron fuertemente a alfa-amilasa de tenebrio, pero fueron inactivas sobre otras amilasas. La proteína 0.19 fue un fuerte inhibidor de alfa0amilasa de saliva humana y de amilasa de páncreas de pollo, además de inhibir la alfa-amilasa de Tenobrio.

Los niveles de inhibición fueron: 35% para - - 0.19 sobre alfa-amilasa salival y la amilasa de Tenebrio, no inhibió las amilasas de hongo y bacterias; la albúmina 0.28 inhibió en un 64% la actividad de alfa-amilasa de -- Tenebrio; las proteínas 0.32, 0.35, 0.39 y 0.48 inactivaron la alfa-amilasa de Tenebrio en 30, 27, 62 y 25%, -- respectivamente.

En 1974, Petrucci, et al (25) compraron a las proteínas albuminóideas del trigo que inhibían la actividad de alfa-amilasa y tripsina. Estas albuminas las obtuvieron a partir de un extracto del trigo completo, seguido de una precipitación con sulfato de amonio. El precipitado albumoideo fué separado por filtración en gel de sefadex G-100 obteniéndose 5 fracciones, tres de las cuales (II, III, y IV) fueron activas inhibiendo algunas alfa-amilasa de insectos, sus pesos moleculares fueron 60 000, 24 000 y 12 500 D. Sólo la fracción III inhibió las alfa-amilasas salival y pancreática. Las fracciones III y IV-

además inhibieron la tripsina. En cada fracción activa - encontraron algunos componentes inhibidores de alfa-amilasa, ligeramente diferentes en sus movilidades electroforéticas, pero en las fracciones III y IV sólo se encontró un componente importante inhibidor de tripsina. Al realizar la electroforesis a pH 8.5 las proteínas que inhibían alfa-amilasa migraron hacia el anodo, en tanto que las que inhibían la tripsina migraron hacia el cátodo. La cantidad de proteínas que inhibieron amilasas formaron las dos terceras partes de las albuminas totales.

Estos autores también encontraron una estrecha relación entre las fracciones que obtuvieron y los inhibidores reportados anteriormente por otros autores. La fracción IV que ellos encontraron es semejante al inhibidor  $AmI_1$  de Shainkin y Birk en 1970, esta fracción también es semejante al inhibidor 0.28 de Silano et. al. (1973), la fracción III fué similar al inhibidor 0.19 descrito por Saunders y Lang así como al inhibidor I descrito por los mismo autores en 1973, además la fracción fué semejante al inhibidor  $AmI_2$  de Shainkin y Birk en 1970.

Además de identificar a los dos inhibidores antes mencionados encontraron uno más en la fracción II.

En 1974 también, Bedetti, Bozzini, Silano y Vittozzi (26), estudiaron la incidencia de las fracciones con actividad antiamilolítica en tres diferentes tipos de trigo. El estudio fué tratado desde un punto de vista genético. Estos autores encontraron cuatro fracciones activas en total, de las cuales solo se encuentran tres como máximo en las diferentes variedades. La actividad inhibitoria fué medida sobre alfa-amilasa de la larva de Te-nebrio molitor L. y alfa-amilasa de saliva humana.

En los trigos diploides (con dos genómas), no se detecta actividad inhibitoria, sin embargo, en todos los trigos tetraploides y hexaploides, así como en las especies de *Aegilops* estudiadas, se encontraron algunos grupos inhibidores de amilasas, todos los grupos tuvieron diferentes pesos moleculares. En cada grupo encontraron diferentes componentes inhibitorios, esta diferencia se basa en las movilidades electroforéticas. Los componentes presentaron fuerte actividad inhibitoria, pero ésta resultaba idéntica sobre las diferentes amilasas estudiadas.

Más recientes estudios, en 1975, Silano et al. (27) probaron la inhibición que producían las proteínas albuminoides del trigo sobre amilasas de diferentes orígenes. Los extractos acuosos con actividad amilolítica estudiados fueron: 17 de insectos, 23 de especies marinas, 18 de aves y mamíferos, las de algunos cereales y las propias amilasas del trigo, en diferentes estudios de maduración. Determinaron la inhibición de las amilasas de estos extractos, causada por las tres fracciones albuminóideas separadas por Petrucciet al. en 1974. Los extractos de los insectos que son destructivos al grano de trigo y sus productos almacenados mostraron mucha mayor actividad amilolítica que la mostrada por otros insectos que no atacan al trigo. Para comparar la efectividad con la cual las tres fracciones albuminóideas inhibían la actividad amilolítica, las preparaciones de amilasas estudiadas fueron divididas en susceptibles, parcialmente susceptibles y resistentes. Las amilasas susceptibles fueron inhibidas por las tres fracciones, dentro de éstas se encontraron la mayoría de las amilasas de insectos que atacan al trigo y las amilasas de algunas especies mari-

nas. Las amilasas parcialmente susceptibles, inhibidas por una o dos de las fracciones, fueron las de algunas aves y mamíferos, incluyendo al hombre. Las amilasas-resistentes se encontraron ampliamente distribuidas en los cereales, aves y mamíferos, así como en las de los insectos que no atacan al trigo. En ningún estadio del desarrollo del grano de trigo fueron inhibidas las amilasas del propio grano.

La fracción de 12 500 D (fracción IV de Petrucci) fue más efectiva para inhibir las amilasas de los insectos, pero fué inactiva contra las amilasas de aves y mamíferos.

La fracción de 24 000 D (fracción III) fue la más efectiva para las amilasas de aves marinas y mamíferos y fue la que inhibió a 33 de las 66 amilasas probadas.

Con estos datos sugirieron que las proteínas que inhiben a las amilasas constituyen una selección natural para los trigos poliploides, ya que dan resistencia hacia algunos insectos que lo atacan.

Uno de los usos que se ha dado a estos inhibidores se reportó en 1975 por Buonocore, Poerio, Gramenzi y Silano (28) que uniendo covalentemente las fracciones III y IV de Petrucci a Sefararosa-2B lograron preparar una columna para la purificación de amilasas, debido a su afinidad. Los autores reportaron los procedimientos de unión de las proteínas inhibidoras a la sefarosa y la elusión específica de las amilasas adsorvidas en el gel, por medio de una alta concentración de maltosa.

Por medio de estos procedimientos lograron purificar las amilasas de Tenebrio molitor L, páncreas de pollo y saliva humana. En todos los casos encontraron amilasas homogéneas por medio de electroforesis ácida y alcalina. En el caso de las amilasas salivales encontraron actividades específicas y patrones electroforéticos similares a los obtenidos por otros métodos.

Dentro de los últimos reportes publicados referentes a la presencia de inhibidores de enzimas amilolíticas, fué realizado por Powers y Whitaker (29) en 1975, que encontraron una fracción homogénea que inhibió la actividad amilolítica, en extractos acuosos de diferentes tipos de frijol. Estos autores purificaron al inhibidor por medio de calentamiento diferencial, fraccionación con etanol, cromatografía de exclusión en geles y cromatografía de intercambio iónico, encontrando una fracción homogénea por medio de electroforesis en gel. Estudiaron la cinética de la inhibición encontrando que la velocidad de formación del complejo amilasa-inhibidor es muy pequeña (no se completó en 90 minutos a 30°C) y fue sumamente dependiente de la temperatura. El inhibidor fué completamente estable a un tratamiento de 60°C manteniendo durante 30 minutos, estando en solución a pH 4, y fué mucho más estable en harinas y en los frijoles intactos.

## III. - MATERIALES Y METODOS.

## M A T E R I A L E S

## GRANOS ANALIZADOS.

IG-71 T 440 # Sin. 2 "Chapalote"  
 H-367 P F-2 "F-2"  
 C.P. 1971 Méx. 5 "Pal. Tol".  
 C.P. 1971 Jal. 78 "Dulce de Jalisco"  
 CH-71 1741 # Chih. 146 "Gordo"  
 CH-73 461 # Tlax. 251 "Elotes Cónicos"  
 IG-73 A<sub>2</sub> 86# Dgo. 93 "Bofo"  
 CH-71 1930 # Chih. 216 "Cristalino de Chihuahua"  
 CH-71 1751 # Chih. 177 "Apachito"  
 H-28 "H-28"

Alfa-Amilasa bacteriana comercial (Fulka 50798 cat. 10070)

## REACTIVOS.

Almidón soluble p.a. (Merck 1252)  
 Almidón para determinar diastasa (Merck 1259)  
 Acetato de sodio trihidratado (Baker Analyzed 3470 M 21899)  
 Acido clorhídrico p.a. (Baker Analyzed 952)  
 Acido Succínico (Fulka 5116 cat. 14080)  
 Bicarbonato de sodio U.S.P. (Merck 6323)  
 Carbonato de sodio anh. p.a. (Merck 206392)  
 Cloruro de calcio dihidratado crist. p.a. (Merck 2382)  
 Cloruro de sodio crist. p.a. (Merck 106404)  
 Cloruro mercúrico p.a. (Merck 4419)

- Maltosa monohidratada para bioquímica (Merck - -  
5912)  
Molibdato de amonio tertahidratado (Merck 101182)  
Sulfato de cobre pentahidratado (Baker Analyzed - -  
1843)  
Sulfato de sodio anh. p.a. (Merck 6649)  
Tartrato doble de sodio y potasio tetrahidratado - -  
(Merck 8087)  
Yodo re-sublimado p.a. (Merck 4761)  
Yoduro de potasio crist. r.a. (Técnica Química S.  
A. 2530)

#### OTROS.

- Agrolita (Material inerte para sembrar) Fabricado-  
por Dicalite de México S.A.  
Cloralex (Solución desinfectante) Elaborada por Pro-  
ductos Químicos Alen S.A.

## A P A R A T O S

Centrifuga M. S. E. Modelo LR-6

Potenciómetro Corning Modelo 12 con electrodo - -  
Sargente S-30050-15C

Espectrofotómetro Carl Zeiss M4 QIII

Balanza Analítica Metter Tipo H6 Capacidad 160 g -

Colorímetro-Espectrofotómetro Bausch & Lomb Mo -  
delo Spectronic 20

Placa Calentador-Agitador Thermolyne Modelo Nuo  
Shir-Plate

Baño a temperatura constante J. M. Ortiz S. I. C. - -  
DGE 774

Prensa de mano. - Fué utilizado un aparato casero  
comúnmente utilizado para preparar tortillas.

## M E T O D O S

## 1. - Selección de los granos.

Los maíces utilizados para el presente trabajo se enumeraron en la sección de materiales.

Los granos de cada variedad se escogieron de acuerdo al tamaño, tomándose en cuenta que se encontrarán completos y serán lo más uniformes posible. Cada-grano fué pesado utilizándose para las determinaciones - los de peso más semejante.

## 2. - Siembra.

Después de seleccionados los granos, se desinfectaron colocándolos en una solución al 20% de solución-desinfectante "Cloralex" (nombre comercial), dicha solución contiene 6% de cloro activo, por lo que la solución-desinfectante de trabajo contenía 1.2% de cloro activo.

Una vez remojados los granos, se enjuagaron de tres a cinco veces con agua de la llave y tres veces - con agua desionizada.

La siembra propiamente dicha se realizó en - un material inerte llamado "Agrolita", el cual fue lavado con agua corriente, con ayuda de unas pinzas de acero - se acomodaron los granos dejando un espacio de 1 cm en - tre cada grano.

## 3. - Germinación.

Para la selección del grano germinado, se tomó en cuenta el tamaño de los Brotes, en cada día de -

germinación, utilizándose sólo aquellos que eran semejantes.

No fueron controladas ni la intensidad de luz ni la temperatura durante la germinación.

#### 4. - Extracción enzimática.

Se seleccionaron los granos con un grado de germinación similar, si ya tenían raíz y tallo, éstos fueron eliminados con un bisturí, los granos sin brotes fueron pesados y cortados con el bisturí para obtener pequeñas partículas, las cuales fueron trituradas en un mortero de porcelana hasta obtener un material de apariencia polvosa (si el grano estaba en los primeros días de germinación) o bien una pasta, cuando la germinación estaba muy avanzada (a medida que sucede la germinación el grano va perdiendo su dureza). Al material obtenido se agregó una cantidad tal de solución de cloruro de calcio 20 mM y cloruro de sodio 200 mM, a obtener la concentración enzimática deseada.

La extracción se realizó colectando pequeñas fracciones de dos a cinco veces. El extracto así obtenido se centrifugó durante 20 minutos a 1190 xg a una temperatura de 4°C.

El extracto centrifugado debe mantenerse en hielo y usarse dentro de la primera hora después de realizada la extracción, ya que la actividad amilolítica decae rápidamente.

#### 5. - Determinación de la actividad amilolítica.

Con este propósito se estudiaron dos métodos distintos:

- a) Método de Nelson por valores de reducción (30)
- b) Método de tinción de yodo. (31)

a) Método de Nelson por valores de reducción.

Sustrato. - Se prepara una solución de almidón soluble en agua caliente, se enfría y se diluye a un volumen que contenga 20 mg/ml de almidón. Esta solución se diluye 1:1 con un buffer de acetatos 0.04 M, pH-5.0. Esta nueva solución contiene 10 mg/ml de almidón. Se centrifuga 20 minutos a 1190 xg y el sobrenadante se utiliza como sustrato.

Reactivos de Nelson.

Reactivo A. - En 800 ml de agua se disuelven 25 gramos de carbonato de sodio anhidro, 25 gramos de tartrato doble de sodio y potasio, 20 gramos de bicarbonato de sodio y 200 gramos de sulfato de sodio anhidro. - Se afora a un litro con agua desionizada y se filtra si es necesario.

Reactivo B. - En 200 ml de agua desionizada - conteniendo cuatro gotas de ácido sulfúrico concentrado - se disuelven 30 g de sulfato de cobre pentahidratado.

Reactivo C. - 25 g del molibdato de amonio - se disuelven en 450 ml de agua desionizada conteniendo - 21 ml de ácido sulfúrico concentrado; aparte, se disuelven en 450 ml de agua desionizada conteniendo 21 ml de ácido sulfúrico concentrado; aparte, se disuelven 3 gramos de arsenato de sodio heptahidratado en 25 ml de agua desionizada y se agregan lentamente a la solución anterior, cuidando que se encuentre con agitación constante.

Toda la solución se diluye a 500 ml y se calienta cuidadosamente por 30 min en un baño de agua a  $55^{\circ}\text{C}$  o se deja en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  por toda la noche.

Ractivo D. - Se prepara mezclando 1 ml del reactivo B con 25 ml de reactivo A. Este reactivo debe ser preparado poco antes de realizar la determinación.

#### Procedimiento.

1.0 ml de la solución enzimática propiamente diluida se agrega a 1.0 ml de la solución de sustrato. Después de 10 min de incubación a  $25^{\circ}\text{C}$ , una porción del digerido de 0.5 a 1.0 ml se agrega a 1.0 ml del reactivo D recién preparado. El volumen es llevado a 2.0 ml con agua desionizada, esta solución es puesta en un baño de agua hirviente por 20 min, enfriando después al chorro de agua por 5 min. A la mezcla se agrega 1.0 ml del reactivo C y se agita hasta que ya no se desprenda  $\text{CO}_2$ ; solución se deja reposar 10 min antes de diluir a 25 mililitros con agua desionizada. La absorbancia se mide en un colorímetro con filtro verde o con un espectrofotómetro a 520 nm.

El blanco se prepara con 1.0 ml de agua desionizada o solución para la extracción de la enzima en vez de la solución enzimática, dándole el mismo tratamiento, que a los demás tubos.

Se prepara una curva standard utilizando maltosa monohidratada, tratando las diluciones desde el uso del reactivo D.

#### b) Método de tinción de yodo.

Sustrato. - Se prepara de igual manera que el

utilizado para el método de Nelson, pero en este caso -  
conteniendo la décima parte del almidón, o sea, 1 mg/ml  
de almidón después de diluir con el buffer.

Reactivo de tinción. - Primeramente se prepara -  
una solución stock de yodo conteniendo 500 mg de yodo -  
resublimado y 5.0 g de yoduro de potasio, en 100 ml de  
agua desionizada.

El reactivo de trabajo se prepara poco antes -  
de ser usado y está formado por 1.0 ml de la solución -  
"stock" de yodo y 100 ml de ácido clorhídrico 0.1 M.

Procedimiento.

Al 1.0 ml de sustrato se agregan 0.1 ml de -  
la solución enzimática previamente diluida y se mantiene  
a 25°C por 2 min, después de los cuales se agrega a la  
mezcla 2.0 ml del reactivo de yodo en ácido clorhídrico,  
se agita perfectamente y se diluye a 6.0 ml con agua -  
desionizada.

La absorbancia se mide 620 nm contra un - -  
blanco conteniendo únicamente yodo. Aparte se prepara -  
un control con la solución de yodo y la solución de almi-  
dón tratadas de la misma manera.

6. - Determinación de la actividad inhibitoria.

La actividad inhibitoria fué medida como el -  
porcentaje de, la actividad inicial que desaparecía por la  
acción de algún factor presente en el extracto por anali -  
zar.

Una parte de la muestra enzimática (solución-

de alfa-amilasa bacteriana comercial o extracto de grano germinado) era analizada para determinar su actividad amilolítica, diluyéndola 1:1 con la solución de extracción. Otra porción era mezclada con un volumen igual del extracto de maíz que supuestamente contenía al inhibidor, e inmediatamente se media la actividad amilolítica remanente. Una tercera determinación de actividad amilolítica fue realizada en el extracto "inhibidor", ya que éste provenía de extractos completos de los granos de maíz sin germinar y en algunos casos se detectó actividad amilolítica.

El extracto inhibidor se preparó triturando una cantidad conocida de granos de maíz sin germinar, en una prensa de mano, a obtener pequeñas partículas, las que se trasladaron a un mortero de procelana y fueron extraídas con la solución de cloruro de calcio y cloruro de sodio, de la misma manera que los extractos para medir actividad amilolítica total. La cantidad de solución agregada fue la suficiente para tener una concentración final de 0.1 g de grano/ml de extracto.

#### IV. - RESULTADOS Y DISCUSION.

##### 1. - Determinación de la actividad amilolítica.

Para la determinación de los niveles de actividad amilolítica se estudiaron dos procedimientos distintos: el método de yodo y el de Nelson. De los métodos anteriores se llegó a la conclusión de que el de yodo es el más adecuado para el tipo de trabajo realizado en esta tesis, por los siguientes motivos:

a) El método de Nelson, que es muy preciso, presenta el inconveniente que bajo las condiciones experimentales utilizadas para la preparación de los blancos y controles, agregando ácido clorhídrico 0.1 M para detener la acción enzimática y el tratamiento con temperatura necesaria para la formación de óxido cúprico que se medirá después, se produce una hidrólisis inespecífica del almidón endógeno del grano, obteniéndose una cantidad desconocida y variable de reductores, lo cual complica la interpretación real de los datos obtenidos.

b) El método de yodo, en que se mide la coloración producida por la interacción yodo-almidón, no presentó problemas, y a que la cantidad de almidón endógeno del grano, aún sin germinar, resultó ser muy pequeña, de tal manera que no presentaba interferencia en las mediciones de almidón residual, después de realizarse la actividad amilolítica.

Además, en este método, en que no se requiere tratamiento con temperatura para producir las sustancias que en última instancia indiquen la actividad, no se presentan cambios en la cantidad de almidón endógeno o en la del almidón agregado.

Existen otros métodos para determinar actividad amilolítica, como el de Bernfeld, que utiliza ácido 3,5-dinitrosalicílico para medir el aumento en el poder reductor de una solución de almidón, pero además de que presentaría los mismos problemas que el método de Nelson, ha sido reportado que el reactivo usado en este método no presenta igual respuesta a cadenas de carbohidratos de diferentes pesos moleculares (32), por lo que este método se deshecho desde un principio.

El buffer utilizado en un principio fué el de acetatos por ser el más reportado para medir este tipo de actividad enzimática, pero en comunicaciones personales de los doctores Kith Varty y Joe Varner, se nos informó que este buffer tenía cierto efecto desfavorable en la actividad amilolítica, las razones aún no son conocidas. Por tal motivo se cambió el buffer de acetatos por el desuccinato, escogiéndose un pH de 5.0 y una concentración de 0.08 M que son las condiciones reportadas para determinar la actividad amilolítica en tejidos vegetales.

Para encontrar el tipo de sustrato más útil en la determinación de la actividad amilolítica tan importante en este trabajo, se estudió el comportamiento de las enzimas alfa y beta-amilasa sobre dos tipos de sustrato:

a) Almidón soluble (Merck), es una proporción de almidón parcialmente hidrolizado, por lo tanto con cadenas cortas.

Este almidón, como puede observarse en la Figura 6, resulto ser un mejor sustrato para beta-amilasa, que lo digiere a razón de 155 microgramos/minuto, en tanto que alfa-amilasa lo digiere 47.74% más lento, o sea a 81 microgramos/minuto.

b) Almidón para determinar diastasa (Merck).- Este almidón se obtiene de la papa sin ninguna modificación por lo que se encuentra en su estado natural de cadenas largas con numerosas ramificaciones. Por esta razón este almidón resulta ser un excelente sustrato para determinar la actividad de alfa-amilasa. Como se observa en la Figura 7 las velocidades de digestión de las dos enzimas fueron de 384 microgramos/minuto y 100 microgramos/minuto para alfa y beta-amilasa respectivamente.

En los cuadros 8 y 9 se muestran los valores obtenidos para la preparación de las gráficas mostradas en las figuras 6 y 7.

Nuestro interés principal es el de medir la actividad de alfa-amilasa por ser esta enzima una de las principales causantes de la degradación del almidón de reserva del grano al iniciarse la germinación, por lo que el encontrar algún factor que inhiba su actividad permitiría avanzar en el entendimiento de este proceso en el metabolismo de carbohidratos en cereales, principalmente en maíz que es el de interés para este estudio.

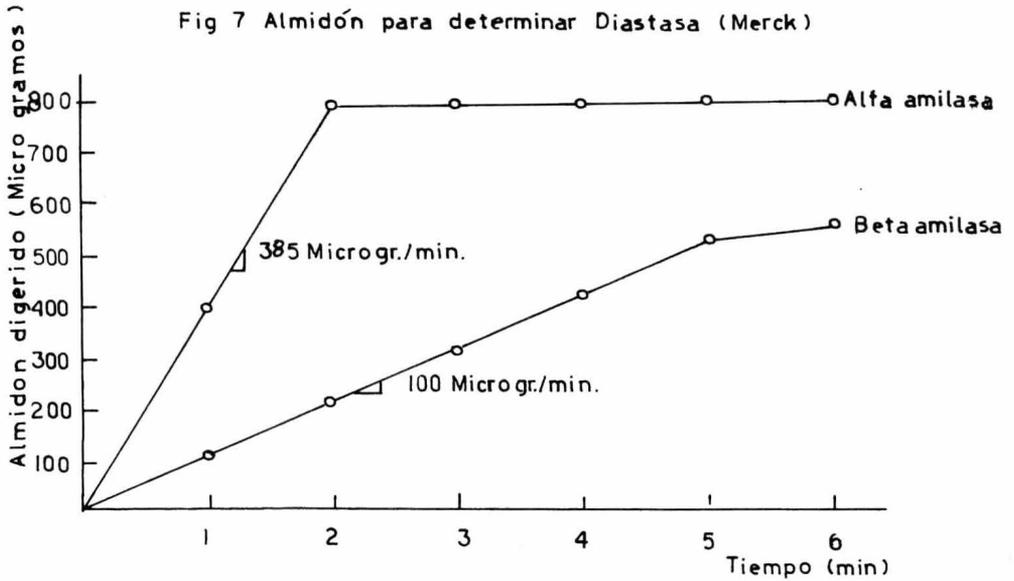
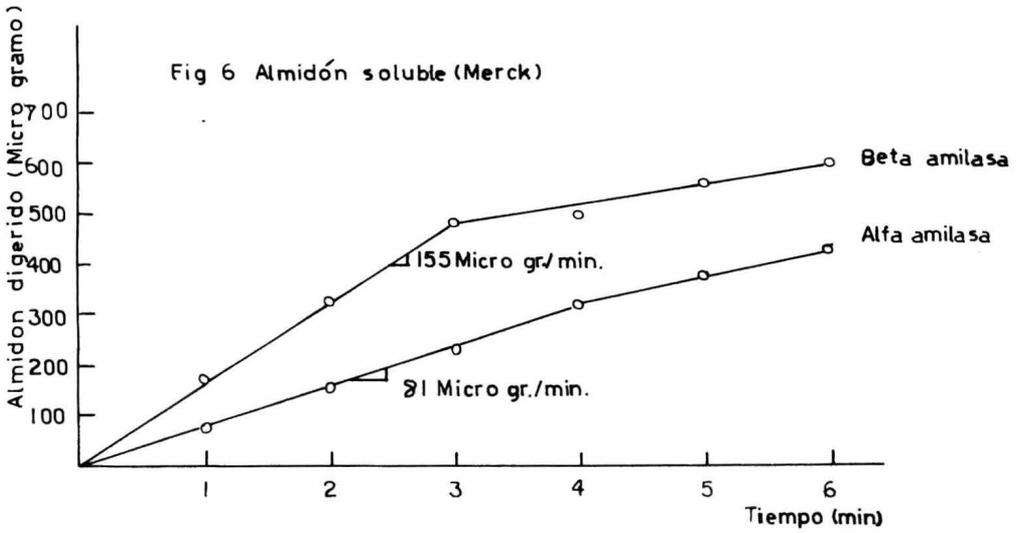
## 2. - Cálculos de la actividad amilolítica.

Utilizando el método de yodo, la actividad amilolítica se reportó en unidades arbitrarias, definidas como la fracción de almidón digerido por gramo de tejido, o sea:

$$U = \frac{D - D'}{D} n$$

En esta ecuación D es la absorbancia del complejo almidón-yodo en ausencia de enzima; D' representa-

ACTIVIDAD DE ALFA Y BETA AMILASA SOBRE DIFERENTES  
SUSTRATOS



la absorbancia del complejo almidón-yodo después de haberse realizado la digestión del almidón por la enzima; y es la dilución realizada para mantener la relación  $D - D'/D$  entre los valores 0.2 y 0.7. Esta dilución se reportó en ml de solución extracto que contenían lg de tejido, así, una solución preparada con 0.5 g de grano en 10 ml de extracto tendrá una  $n = 20$ .

### 3. - Niveles de actividad amilolítica a diferentes días de germinación.

Se realizaron determinaciones de actividad amilolítica a diferentes días de germinación, de todos los granos, utilizando el método de yodo.

Estas determinaciones se realizaron con los extractos centrifugados, en tres condiciones diferentes:

- a) Sin ningún cambio (Temperatura Ambiente)
- b) Calentándolo a 70°C durante 10 minutos.
- c) Agregándole cloruro mercúrico a tener una concentración de 0.001 M.

El objeto de estas determinaciones fue encontrar el día en que el nivel de actividad amilolítica debida a alfa-amilasa era mayor. Se estudiaron los primeros 7 días, ya que se sabe que durante los primeros días de germinación la actividad amilolítica se debe principalmente a la actividad de esta enzima.

Los tratamientos a 70°C durante 10 min y con cloruro mercúrico han sido reportados, por separado, como buenos métodos para eliminar la actividad de beta-amilasa, de tal manera que la actividad que se determine después de los tratamientos antes mencionados, se deberá exclusivamente a la actividad de alfa-amilasa.

El cloruro mercúrico es un reactivo que se une irreversiblemente a los grupos -SH de las proteínas, teniendo mayor afinidad por los grupos que se encuentran en el sitio activo de las enzimas.

La mayoría de las alfa-amilasas que se han encontrado no tienen grupos -SH en su sitio activo, pero este hecho no descarta que algunas alfa-amilasas contengan estos grupos, como se demostró en el trabajo de tesis de Elisa Labansat (7) que estudiando la preparación de una columna de afinidad para separar isoenzimas de amilasas, encuentra que algunas formas de alfa-amilasa interaccionan con reactivos mercuriales.

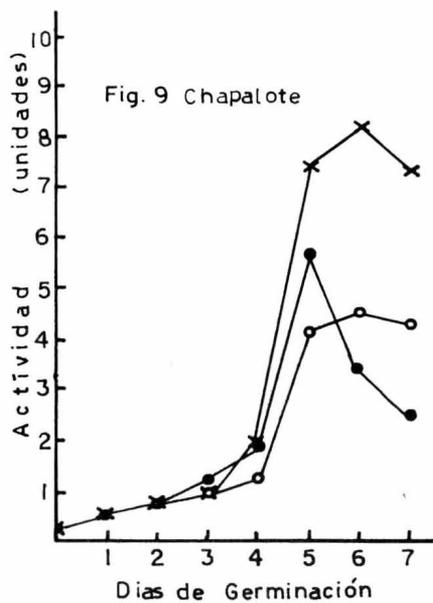
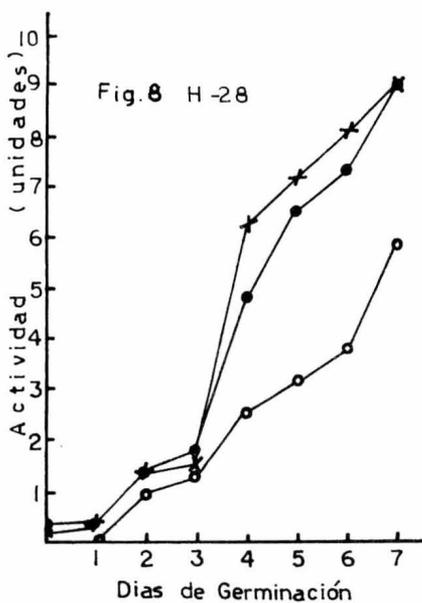
Por esta razón podemos explicar la diferencia en los niveles de actividad amilolítica al tratar los extractos de los granos de maíz con temperatura y cloruro mercúrico, ya que como se menciono antes, los dos tratamientos inactivan beta-amilasa y por lo tanto las actividades deberían ser semejantes.

En las Figuras 8 a 17 se muestran los niveles de actividad amilolítica encontrados para los 10 diferentes granos de maíz, en los siete primeros días de germinación.

Como puede observarse, en todos los casos la actividad amilolítica total en los primeros tres días de germinación es muy baja y después aumenta considerablemente. La actividad debida a alfa-amilasa aumenta de manera similar a la actividad total, hasta el quinto día, después del cual disminuye, llegando a desaparecer en algunos casos.

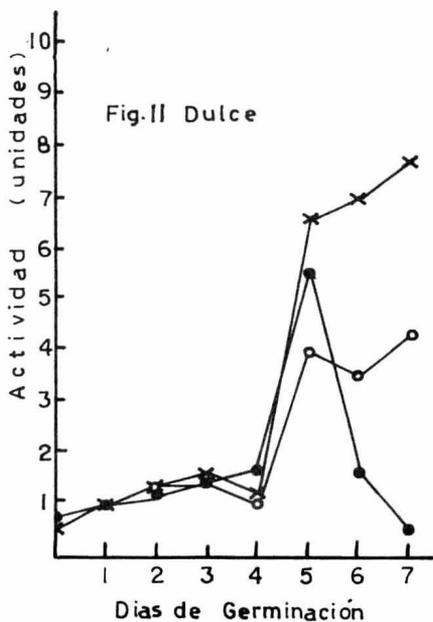
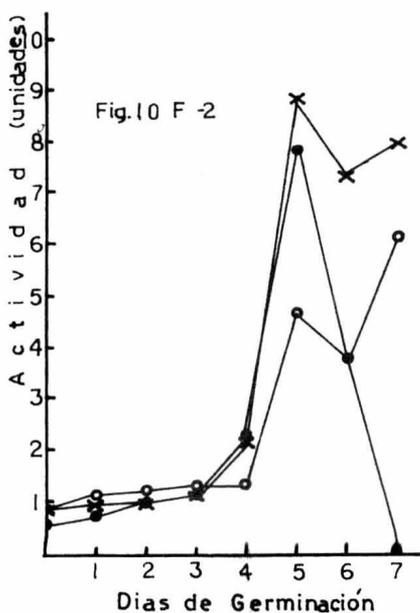
En los cuadros 10 a 19 se presentan los valores de actividad amilolítica en unidades, para cada varie

## Actividad Amilolítica de los Diferentes Granos



X: Temp. Ambiente

●: 70°C 10min.

○: Hg Cl<sub>2</sub> 0.001 M

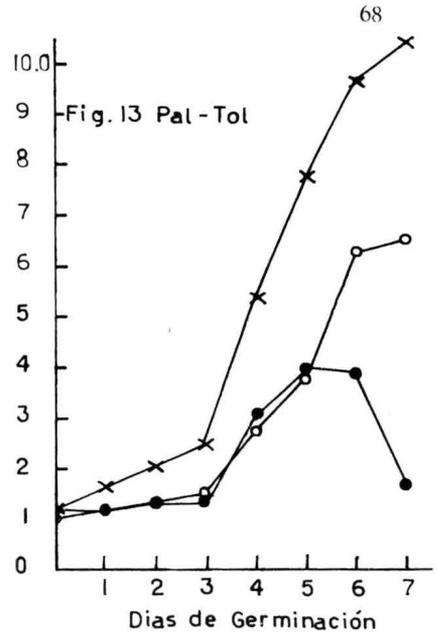
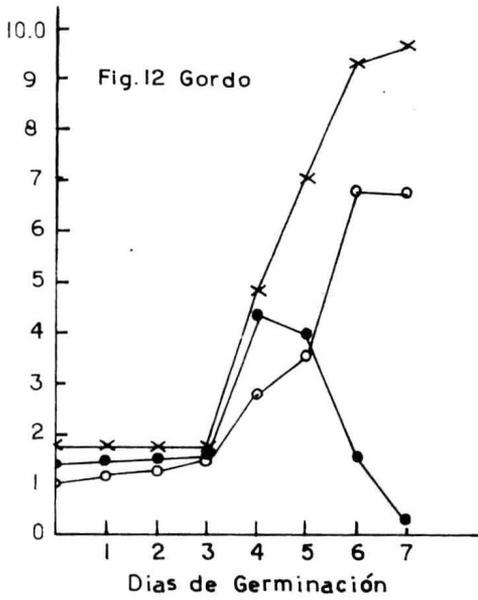
dad de maíz, en germinación de 0 a 7 días, en las tres condiciones.

Notese que en la mayoría de los casos el tratamiento con cloruro mercúrico disminuye más la actividad amilolítica total, que cuando se trata con temperatura, por lo que puede esperarse que algunas alfa-amilasas de maíz contengan grupos -SH en su sitio activo, y ésto provoque este fenómeno.

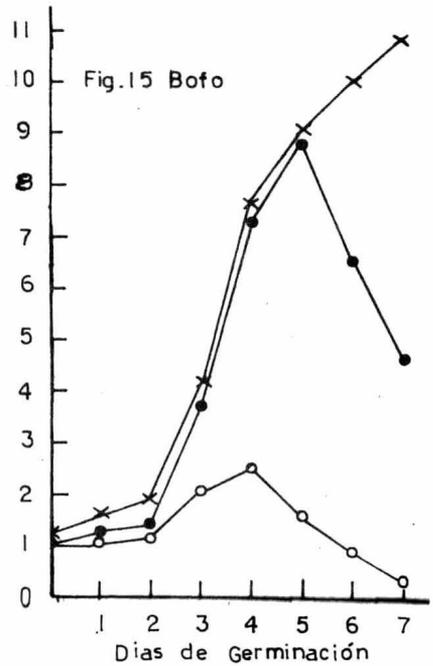
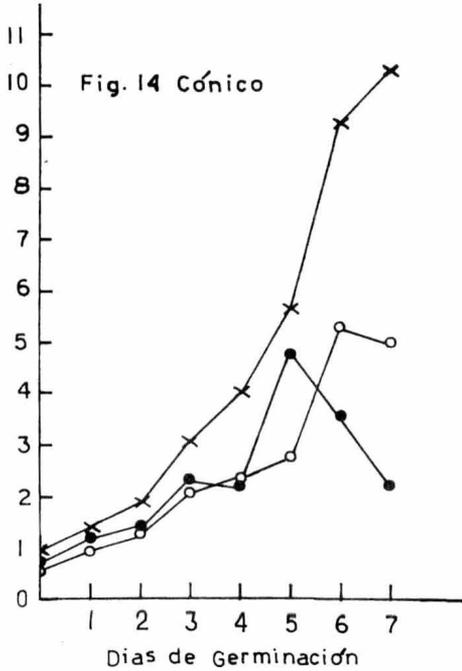
Como puede observarse en las Figuras 10, 11 y 15 que corresponden a los maíces F-2, Dulce y Bofo respectivamente, la actividad total hasta el quinto día de germinación, se puede deber a la actividad de alfa-amilasa, medida inactivando beta-amilasa con temperatura, en tanto que la actividad medida inactivando con cloruro mercúrico resulta ser, en el caso del maíz Dulce, relativamente semejante, en el caso del maíz F-2 es aproximadamente la mitad y en el caso del maíz Bofo es mucho menor. Puede decirse entonces que la sensibilidad de las diferentes amilasas (alfa) frente al tratamiento con cloruro mercúrico es la siguiente: las del maíz Bofo son las más sensibles, siguiéndole las del maíz F-2, para ser las menos sensibles las del maíz Dulce.

El maíz Gordo (Figura 12) se comporta de manera semejante al maíz F-2, pero únicamente hasta el cuarto día de germinación, en el quinto día la actividad de alfa-amilasa, media por cualquiera de los dos métodos de inactivación de beta-amilasa, es aproximadamente la mitad de la actividad total.

En los maíces Cristalino y Apachito (Figuras 16 y 17) se observa que la actividad de alfa-amilasa medida por los dos métodos de inactivación de beta-amilasa, es muy semejante, con diferencia máxima de 35.38% pa -



X: Temp. Ambiente    ●: 70°C 10 min.    ○: Hg Cl<sub>2</sub> 0.001 M



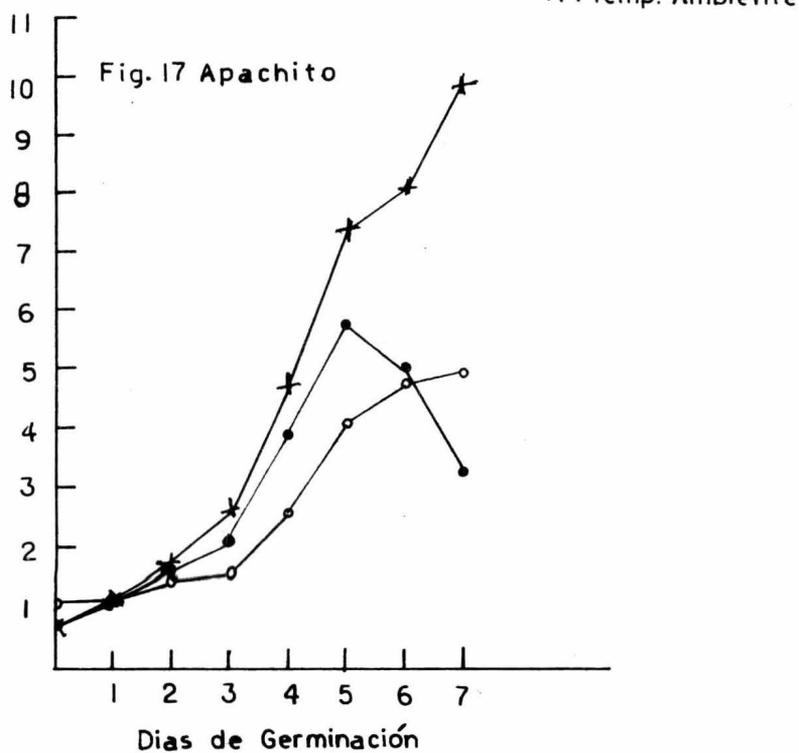
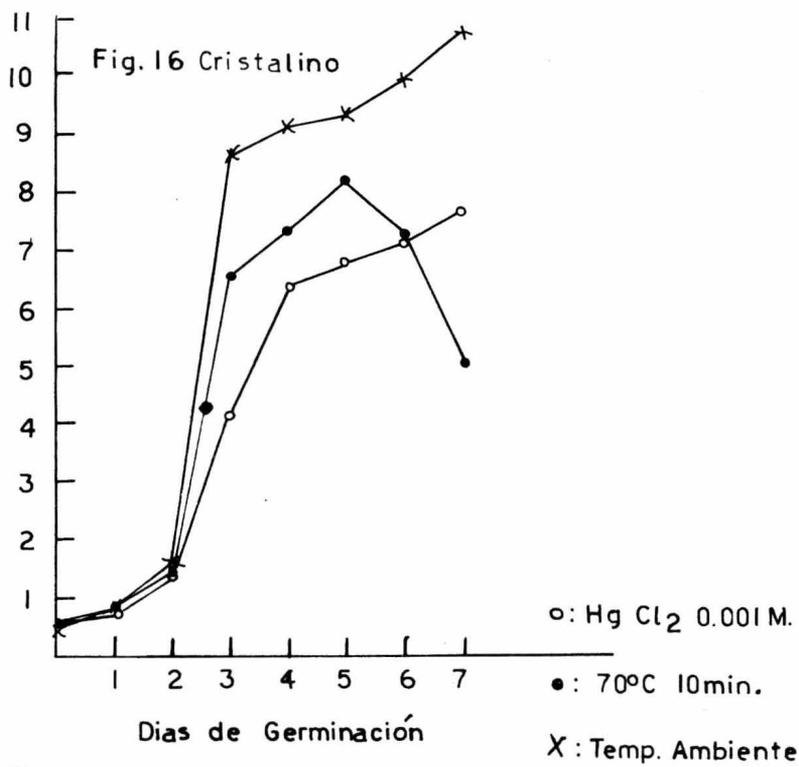
ra el maíz Cristalino (en el tercer día de germinación) - y de 29.32% para el maíz Apachito (en el quinto día). En ambos casos en el sexto día de germinación la actividad de alfa-amilasa medida por los dos métodos de inactivación, es semejante y después de ese día la actividad medida por inactivación con temperatura disminuye, en tanto que la medida después de tratar con cloruro mercurico - aumenta, este fenómeno puede deberse a que la cantidad de mercurio presente no es suficiente para inactivar el total de beta-amilasa en solución.

Este fenómeno también se observa que en los maíces Chapalote, Dulce, Gordo, Pal-Tol y Cónico (Figuras 9 a 14), siendo muy marcado en todos los casos excepto en el maíz Chapalote. Las diferencias máximas - para cada caso son 41.87% para Chapalote, 100% para Dulce, 90.7% para Gordo, 95.59% para Pal-Tol y 82.31% para Conico.

El comportamiento del maíz H-28 (Figura 8) - es muy particular ya que la actividad de alfa-amilasa medida por inactivación con temperatura resulta ser muy semejante a la actividad total, sin disminuir en ningún momento, hasta el séptimo día de germinación. La actividad medida después del tratamiento con cloruro mercurico también aumenta, en menor proporción, pero sin disminuir. Aparentemente en este grano, hasta el séptimo día de germinación, no se ha expresado la actividad de beta-amilasa, medida por el método de yodo, utilizando almidón para determinar diastasa (Merck) como sustrato.

### 3. - Cálculos de Inhibición.

La determinación de inhibición fue realizada - en las mismas tres condiciones que las utilizadas para las determinaciones de actividad amilolítica con el objeto



de discriminar por completo la inhibición de la actividad de beta-amilasa.

La inhibición medida en el extracto de grano sin tratamiento puede deberse a la acción sobre alfa-amilasa, beta-amilasa o mezclas de ambas, así que al medir inhibición después de inactivar beta-amilasa dicha inhibición observada se debería únicamente al efecto sobre alfa-amilasa.

Los cambios de los valores serían los siguientes:

a) Si únicamente inhibe alfa-amilasa, el nivel de inhibición medido después de inactivar beta-amilasa sería mayor que el detectado en el extracto completo.

b) Si únicamente inhibe beta-amilasa, la inhibición medida después de inactivarla sería nula.

c) Cuando la inhibición se realiza sobre las dos enzimas, la inhibición medida después de inactivar beta-amilasa sería menor que la encontrada en el extracto completo.

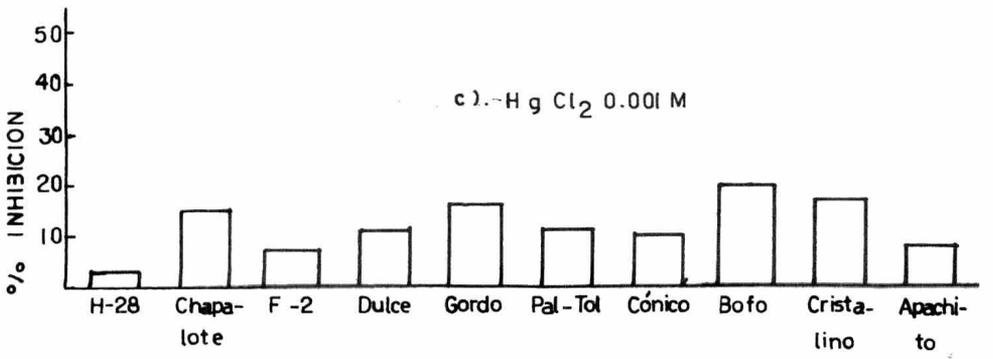
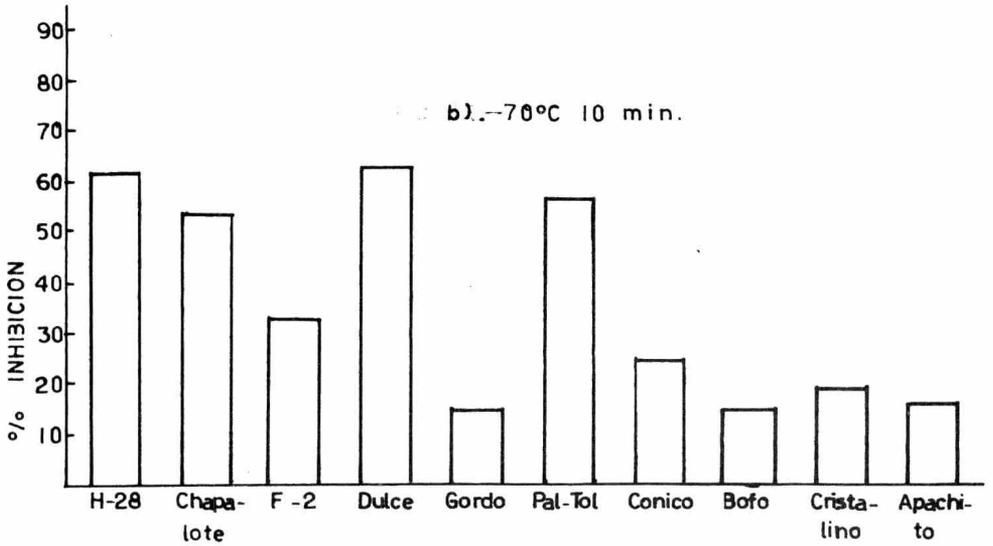
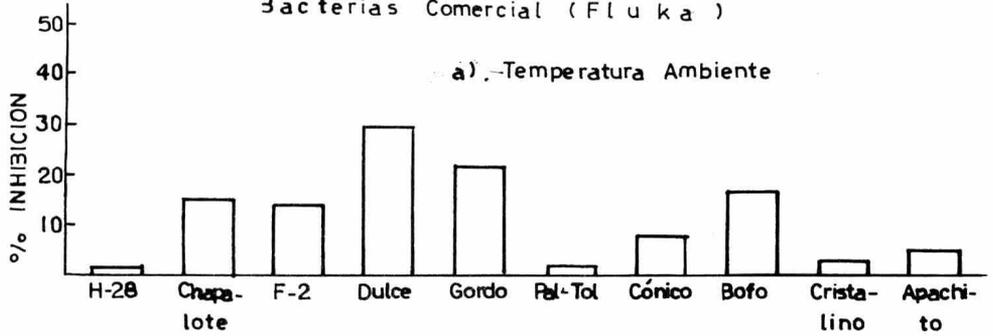
En la Fig. 18 se muestran los niveles de inhibición medidos de los diferentes granos sin germinar sobre alfa-amilasa bacteriana comercial (Fulka). La concentración enzimática utilizada fué de 1.5 mg/ml ya que se encontró que dicha concentración producía una disminución del 50% en la tinción de yodo, al hidrolizar el almidón para determinar diastasa durante dos minutos a 25°C y pH 5.0.

La Figura 19 se ilustran los niveles de inhibición medidos al tratar extractos de los granos después

Fig. 18

Niveles de Inhibición de los diferentes Granos de Maíz sobre  $\alpha$ -Amilasa de

Bacterias Comercial (Fluka)



de cinco días de germinación con un extracto acuoso del maíz H-28 sin germinar.

Como puede observarse en los dos casos la inhibición medida después de los tratamientos para inactivar beta-amilasa son muy diferentes en la mayoría de los granos, lo que nos conduce a postular las causas teniendo las siguientes posibilidades:

a) El tratamiento con temperatura incrementa el poder inhibitorio de los extractos de estudio.

Este incremento puede llevarse a cabo "activando" a algún precursor almacenado del inhibidor, ya sea por eliminación de residuos que bloqueen el "sitio activo" del inhibidor o dejando al descubierto dicho sitio.

b) La enzima alfa-amilasa se sensibiliza por acción de la misma temperatura, haciéndose más fácilmente atacable.

c) El cloruro mercúrico interacciona con las alfa-amilasas sensibles al inhibidor, provocando que la cantidad de alfa-amilasas atacables disminuya, traduciendo en una aparente baja en la inhibición.

Al realizar el experimento con alfa-amilasa pura se esperaba que los niveles de inhibición en las tres condiciones fueran semejantes, ya que se estaba trabajando con la enzima pura, pero se encontró el mismo fenómeno que al trabajar con los extractos completos de los granos germinados.

En los cuadros 19 y 20 se muestran los valores promedio de inhibición obtenidos, el error promedio y la desviación estandard para cada caso.

Las inhibiciones observadas al tratar alfa-amilasa bacteriana comercial con los maíces Gordo y Bofó son semejantes en las tres condiciones estudiadas, lo que puede indicar que el inhibidor no sufre ningún cambio al ser tratado con temperatura y que el cloruro mercúrico no interacciona con las alfa-amilasas sensibles al efecto de dicho inhibidor, en cambio, en el caso de los maíces H-28 y Chapalote se observa que al tratar las mezclas de alfa-amilasa bacteriana y extracto de grano, con temperatura, el nivel de inhibición se incrementa grandemente, en tanto que al tratarlo con cloruro mercúrico, el nivel de inhibición es semejante al encontrado sin tratamiento alguno. La explicación a este hecho sería la "activación" del inhibidor por efecto de la temperatura, sin haber interacción de la enzima susceptible con el cloruro mercúrico.

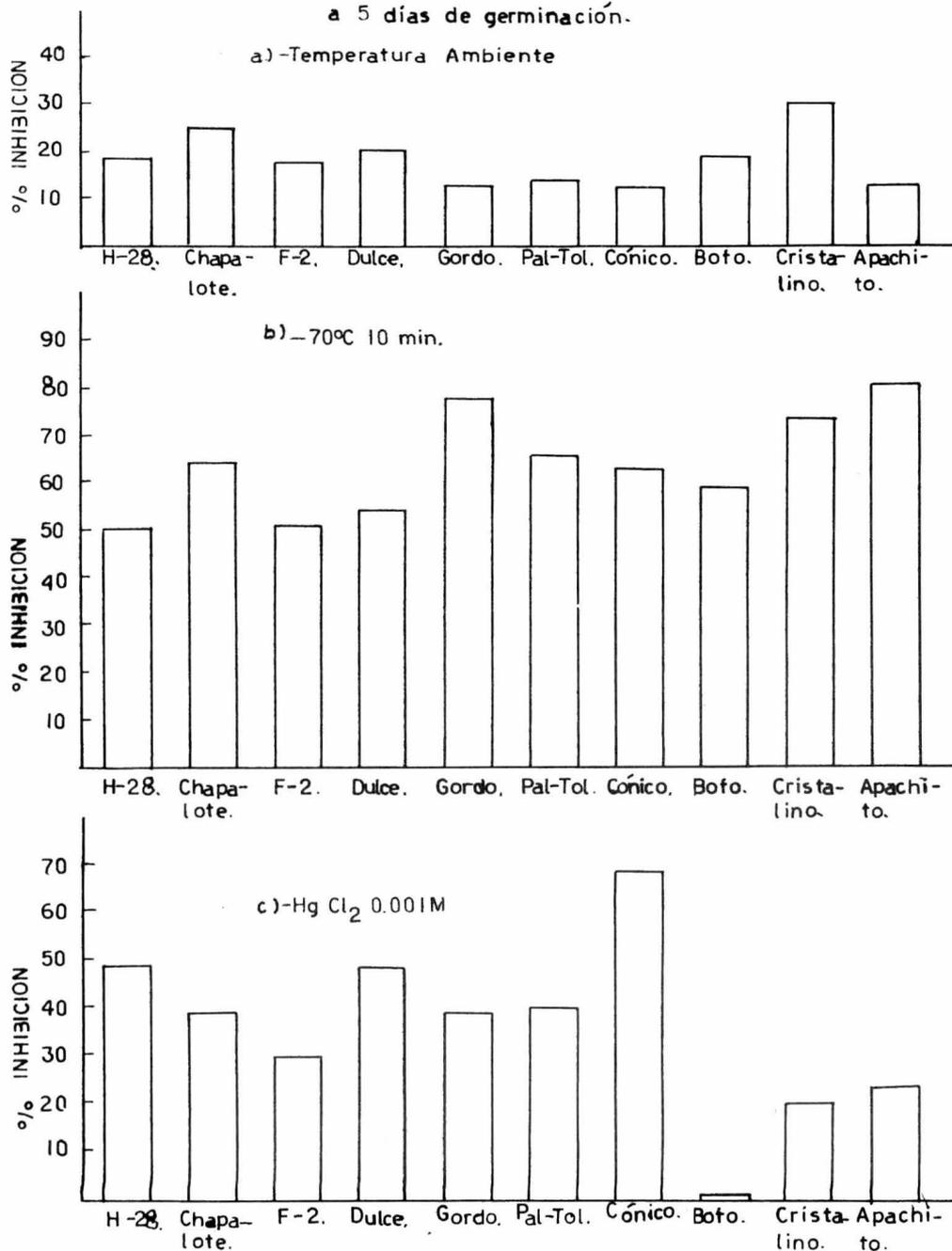
El inhibidor presente en los maíces F-2 y Dulce tiene un comportamiento similar, ya que al tratarlo con temperatura su efecto inhibitorio se incrementa pero al tratar este extracto con cloruro mercúrico dicho efecto disminuye. Este comportamiento puede ser explicado con los postulados antes mencionados que sugieren una "activación" del inhibidor por efecto de la temperatura y una interacción de las alfa-amilasas susceptibles con el cloruro mercúrico.

En el caso del maíz Pal-Tol se observa un marcado incremento del poder inhibitorio después del tratamiento con temperatura, pero al tratar la mezcla enzima-inhibidor con cloruro mercúrico dicho efecto inhibitorio es mayor al observado sin tratamiento.

En el caso del maíz Cristalino este fenómeno es más marcado y en los maíces Cónico y Apachito es menor. La explicación a este hecho no puede ser deter-

Fig. 19

Niveles de inhibición del grano H-28 sobre las amilasas de los granos a 5 días de germinación.



minada con claridad, ya que se implicaría una "activación" del inhibidor por acción del cloruro mercúrico de lo cual no existen antecedentes.

En los maíces Cónico, Cristalino y Apachito el incremento de la actividad inhibitoria por efecto de la temperatura no es muy marcado.

Como puede observarse el comportamiento del factor inhibitorio procedente de los diferentes granos sobre la actividad de alfa-amilasa bacteriana comercial, varía entre ellos, lo cual abre la posibilidad de que existan diferentes inhibidores o bien distintas formas de uno mismo, dependiendo del grano en cuestión.

Al analizar los resultados de la inhibición producida por algún factor presente en el grano H-28 sobre las amilasas de los granos germinados cinco días, se observa lo siguiente:

La inhibición medida sobre las alfa-amilasa de los granos H-28, Dulce y Cónico, después de inactivar beta-amilasa por cualquiera de los dos tratamientos, es igual, independientemente del tratamiento usado, lo que indica que las alfa-amilasas afectadas por este inhibidor presente en el grano de H-28 sin germinar no se ven modificadas por ninguno de los dos tratamientos, y si alguna parte del inhibidor fuera "activada" por el calor, ésta no interviene en la inhibición de las amilasas presentes.

En los casos de los maíces Chapalote, F-2, Gordo, Pal-Tol y Apachito, se encuentra que la actividad inhibitoria medida después de inactivar beta-amilasa por acción de cloruro mercúrico es menor que la medida después de tratar con temperatura y es mayor que la encon-

trada en el extracto completo, estos datos nos indican -- que posiblemente el inhibidor presente en el maíz H-28 - sin germinar actúa sobre las alfa-amilasas presentes en estos maíces a cinco días de germinación, y las diferencias pueden deberse a que el inhibidor sea "activado" por acción de la temperatura, que las alfa amilasas se sensibilicen por este tratamiento o que algunas de las alfa-amilasas susceptibles al inhibidor también interaccionen -- con el cloruro mercúrico.

Únicamente en dos casos, maíces Bofo y Cristalino, se observa que después del tratamiento con cloruro mercúrico la inhibición medida es menor que la encontrada sin tratamiento, en cambio el calentamiento si incrementa grandemente dicha inhibición.

En el caso del maíz Bofo, analizando los niveles de actividad amilolítica en las tres condiciones de estudio, se observa que al quinto día de germinación se puede establecer una relación entre la cantidad de amilasa que no interacciona con el cloruro mercúrico y el nivel inhibitorio encontrado después del mismo tratamiento, y tenemos que la cantidad de alfa-amilasas que no interaccionan con este reactivo tampoco lo hacen con el inhibidor presente en el grano H-28, y por esta razón la inhibición observada es tan pequeña. Al tratar al extracto con temperatura se observa que estas amilasas sensibles al cloruro mercúrico y a la acción del inhibidor son resistentes, por lo que este tratamiento si da como resultado una inhibición de las alfa-amilasas presentes.

Con el maíz Cristalino es más difícil encontrar esta relación ya que la cantidad de amilasa que interacciona con el cloruro mercúrico es muy pequeña en comparación con la actividad de alfa-amilasa resistente a la temperatura, pero aún cabe la posibilidad antes mencionada.

Con el objeto de empezar a conocer la naturaleza química de el factor inhibitorio, se realizaron varios experimentos de inactivación del inhibidor por medio de temperatura, con esta prueba se puede conocer si la sustancia es protéica o no, con las reservas de realizar otros tipos de pruebas más específicas.

En esta prueba se observó que a una temperatura de  $96^{\circ}\text{C}$  con mantenerla solo dos minutos a pH 7.0, el inhibidor era completamente "inactivado".



## V. - CONCLUSIONES. QUÍMICA

Tomando en cuenta los resultados de actividad amilolítica y el comportamiento de las amilasas de los diferentes granos a cinco días de germinación frente a algún factor inhibitorio presente en el maíz H-28 sin germinar, podemos llegar a la siguiente conclusión:

a) Las amilasas de los diversos granos son diferentes entre sí, y

b) El inhibidor presente en el grano H-28 sin germinar es heterogéneo, presentando diferentes fracciones con respuestas diferentes ante distintas amilasas.

De los resultados de inactivación con temperatura, se puede concluir, con las reservas del caso, que el factor inhibitorio puede ser una proteína, un polipeptido de peso molecular grande o una sustancia termolábil en las condiciones de estudio.

En el caso de que después de realizar más pruebas para conocer la naturaleza química del factor inhibitorio, como se pretende hacer, se encontrará que es de naturaleza protéica, este resultado concordaría con lo reportado para los inhibidores presentes en trigo y centeno.

Una vez conocida la presencia de factores inhibitorios de la actividad amilolítica, presentes en los granos de maíz estudiados, se debe pensar en los usos e implicaciones metabólicas que dichos factores puedan tener.

Entre los principales usos que pueden tener -

se encuentran los que requieren una integridad absoluta - del almidón y productos relacionados, ya que estos inhibidores, si están presentes, asegurarían un efecto desfavorable sobre las enzimas sensibles a él que pudieran degradar el almidón que se pretende conservar. Dentro de estas aplicaciones se pueden nombrar a las industrias harineras, y las amilasas que se requeriría fueran inhibidas serían las de insectos y roedores que pudieran atacar al grano almacenado o a los productos amilaseos obtenidos de ellos.

Otra industria que se interesaría en el estudio de estos factores inhibitorios de la actividad amilolítica sería la de fermentación de granos, ya que si estos inhibidores estuvieran presentes se encontrarían efectos desfavorables, ya que si interaccionan con las amilasas de las levaduras o granos malteados utilizados para dicha fermentación, ésta o no se realizaría o sería muy lenta causando pérdidas de tiempo y materiales. En el caso específico del maíz la principal industria afectada sería la cervecera, ya que en algunas ocasiones se utiliza este cereal como material adjunto para obtener el almidón fermentable y si se encontrara algún factor que afectara desfavorablemente la actividad de las enzimas amilolíticas involucradas en este proceso, se obtendrían las pérdidas antes mencionadas.

Por otro lado, si estos inhibidores interaccionan con las amilasas de los organismos que atacan al maíz, estos factores inhibitorios proporcionarían una especie de resistencia a dicho maíz contra las plagas que lo podrían atacar. Esto cobra especial importancia si consideramos que gran parte de las pérdidas de los granos se realiza durante el almacenamiento, ya sea por el ataque de los insectos y pestes o por germinación prematura. Estos

fenómenos pueden ser reprimidos por acción de los inhibidores antiamilolíticos, ya que, en el caso del ataque de las plagas este factor inhibitorio impediría que el animal digiriera el almidón, siempre que las amilasas que él produce fueran sensibles al inhibidor y por lo tanto constituiría un factor antinutricional y dicho organismo terminaría por morir o dejar de ingerir ese alimento.

La germinación prematura podría ser controlada obteniendo, por mejoramiento genético, variedades de maíz con amilasas sensibles al inhibidor, pero no tan sensibles que no le permitieran germinar a su tiempo y en las condiciones apropiadas.

La obtención de las variedades de maíz con un contenido controlado de inhibidores, puede llevarse a cabo si el inhibidor es protéico, ya que el genoma del grano tendría la información genética necesaria para la síntesis de dicha sustancia, y los fitomejoradores y genetistas pueden ser capaces de transferir esta información a otras variedades de maíz, por medio de hibridación.

A pesar de que aparentemente la presencia de la enzima y el inhibidor en el mismo grano pueda parecer paradójico, esto puede indicar que la función inhibitoria "in situ" es un mecanismo de control fino. La presencia o ausencia de la enzima puede ser regulada por otros métodos como síntesis y degradación, mientras que los inhibidores pueden ser utilizados primeramente para un control secundario en los tejidos en que la enzima se expresa fuertemente. La expresión inhibitoria puede ser *dramáticamente reducida* en tejidos con baja actividad enzimática ya que en este tipo de tejidos sólo se requiere una regulación secundaria muy pequeña (33).

A P E N D I C E

CUADRO 1

Usos Alimenticios de los Productos del Maíz Seco.	
Sémola:	Cereales para el desayuno, Botanas, Bebidas maltedas.
Harina:	Pasteles, Botanas, Papillas, Cereales para el desayuno, Bollos y Pan de maíz.
Fécula:	Alimentos para bebé, Productos de pastelería, Productos cárnicos, Cereales para desayuno, Botanas.

## CUADRO 2.

Usos Alimenticios del Almidón de Maíz.
1. - Agente espesante
2. - Estabilizante de emulsiones
3. - Agente gelificante en dulces
4. - Retención de humedad en el decorado de pasteles
5. - Agente aditivo para alimentos
6. - Agente de revestimiento y lustre para carnes y - dulces.
7. - Encapsulación, como en los productos dulcificantes de café.
8. - Desecante de polvos en productos de panadería y - dulces.
9. - Agente antiapelmasante, principalmente en el azú- car.

## CUADRO 3

Consumo "per capita" del maíz como alimento. (porcentaje anual 1964-1966)

Región o País	Consumo promedio - kg/año
Centro-América	140
Sud-Africa, Kenya y Zambia	126
México	113
Albania y Rumania	66
Portugal y Yugoslavia	24
Africa del Norte y Centro	24
Porción Norte de Sud-América	24
Asia del Sur y Este <sup>b</sup>	14
El resto de los países <sup>c</sup>	3

a) Tomado de FAO (6 de 4)

b) 54% de la población mundial

c) 30% de la población mundial

## CUADRO 4

Estadística de la producción maicera en México.  
(quinientos)<sup>a</sup>

Años	Producción en Toneladas.
1925	1 968 732
1930	1 376 763
1935	1 674 566
1940	1 637 687
1945	2 186 194
1950	3 122 042
1955	4 490 080
1960	5 385 877
1965	8 936 381
1970	9 040 558
1971	9 407 460

a) Tomando de Información Estadística y Agropecuaria.

Mayo-Agosto 1972. No. 17-18.

## CUADRO 5.

Aminogramas del Maíz, Frijol y Tortillas<sup>a</sup>, comparados - con los requerimientos de FAO<sup>b</sup>

	Maíz (prom)	Frijol (prom)	Tortilla (prom)	Patrón FAO
g prot/100 g	9.62	19.2	5.9	-----
Aminoácidos g/100 g prot.				
Lisina	2.50	7.20	2.50	4.20
Treonina	4.70	3.97	4.10	2.90
Valina	5.40	4.59	5.30	4.20
Metionina	1.90	1.01	1.90	2.20
Isoleusina	3.68	4.19	5.96	4.20
Leusina	12.50	7.62	16.20	4.80
Fenilalanina	4.40	5.22	4.40	2.80
Triptofano	0.60	1.01	0.65	1.40

a) Tomado de "Valor Nutritivo de Alimentos Mexicanos" Instituto Nacional de Nutrición 1974.

b) Tomado de "Tecnología de Alimentos" Vol X, No. 5 Septiembre-October 1975.

CUADRO 6

Propiedades de algunas amilasas.				
Origen	pH óptimo	Temp. óptima	Temp. de desnat.	Relación lique/sacarif
Pancreática	6.9	46°C	55°C	-----
Hongos	5.0	55 "	82 "	13.0
Malta	5.0	60 "	80 "	3.6
Bacterias	7.0	70 "	93 "	14.0

## CUADRO 7

Actividad amilolítica de alfa y beta -amilasa utilizando como sustrato Almidón soluble (Merck)

Tiempo de incubación	Cantidad de almidón Alfa - amilasa	digerido. Beta -amilasa
0 min	0 microg	0 microg
1 "	75 "	171 "
2 "	157 "	326 "
3 "	221 "	481 "
4 "	320 "	498 "
5 "	370 "	553 "
6 "	423 "	597 "

## CUADRO 8

Actividad amilolítica de alfa y beta-amilasa utilizando como sustrato Almidón para determinar diastasa (Merck)

Tiempo de incubación	Cantidad de almidón digerido Alfa -amilasa	Beta -amilasa
0 min	0 microg	0 microg
1 "	399 "	110 "
2 "	784 "	211 "
3 "	792 "	313 "
4 "	796 "	418 "
5 "	796 "	522 "
6 "	796 "	551 "

Actividad amilolítica de los diferentes granos en los primeros días de germinación. (Unidades)

Cuadro 9.

Grano: H-28

	DIAS DE GERMINACION							
	0	1	2	3	4	5	6	7
T. A.	0.19	0.13	1.34	1.59	6.28	7.24	8.17	9.09
70°C	0.35	0.27	1.35	1.70	4.78	6.50	7.36	9.01
HgCl <sub>2</sub>	0.00	0.00	0.93	1.21	2.54	3.15	3.77	5.98

Cuadro 10.

Grano: Chapalote

T. A.	0.14	0.43	0.68	0.94	1.96	7.42	8.11	7.33
70°C	0.18	0.49	0.69	1.14	1.88	5.71	3.42	2.51
HgCl <sub>2</sub>	0.22	0.50	0.80	0.95	1.20	4.11	4.49	4.29

Cuadro 11

Grano: T-2

T. A.	0.78	0.85	0.93	1.03	2.08	8.08	7.32	7.92
70°C	0.55	0.71	0.87	1.03	2.19	7.80	3.73	0.00
HgCl <sub>2</sub>	0.86	1.03	1.10	1.19	1.28	4.65	3.67	6.07

Cuadro 12

Grano: Dulce

T. A.	0.46	0.88	1.22	1.58	1.13	6.53	6.87	7.59
70°C	0.63	0.91	1.09	1.33	1.57	5.48	1.58	0.40
HgCl <sub>2</sub>	0.64	0.92	1.17	1.41	0.95	3.90	3.42	4.29

Cuadro 13

Grano: Gordo

T. A.	1.71	1.71	1.75	1.76	4.84	7.08	9.37	9.70
70°C	1.34	1.43	1.50	1.53	4.39	3.93	1.54	0.24
HgCl <sub>2</sub>	1.04	1.18	1.25	1.33	2.78	3.60	6.80	6.74

Cuadro 14.

Grano: Pal-Tol.

T. A.	1.15	1.60	2.02	2.48	5.34	7.72	9.65	10.40
70°C	1.22	1.22	1.30	1.33	3.05	3.99	2.83	1.64
HgCl <sub>2</sub>	1.07	1.18	1.34	1.42	2.76	3.78	6.27	6.49

Cuadro 15

Grano: Cónico								
	DIAS DE GERMINACION							
	0	1	2	3	4	5	6	7
T. A.	0.90	1.39	1.83	3.04	3.93	5.66	9.22	10.29
70°C	0.75	1.12	1.39	2.29	2.13	4.71	3.52	2.18
HgCl <sub>2</sub>	0.56	0.87	1.11	2.02	2.33	2.79	5.27	4.98

Cuadro 16

Grano: Bofo								
	0	1	2	3	4	5	6	7
T. A.	1.16	1.52	1.81	4.18	7.69	9.07	9.99	10.82
70°C	1.00	1.23	1.39	3.68	7.26	8.86	6.47	4.49
HgCl <sub>2</sub>	0.96	9.98	1.12	2.01	2.47	1.45	0.82	0.29

Cuadro 17

Grano: Cristalino								
	0	1	2	3	4	5	6	7
T. A.	0.40	0.83	1.59	8.66	9.15	9.36	9.97	10.79
70°C	0.63	0.84	1.41	6.57	7.35	8.18	7.31	5.07
HgCl <sub>2</sub>	0.55	0.75	1.39	4.20	6.42	6.83	7.12	7.69

Cuadro 18

Grano: Apachito								
	0	1	2	3	4	5	6	7
T. A.	0.63	1.22	1.70	2.57	4.71	7.36	8.03	9.88
70°C	0.71	1.15	1.57	2.05	3.84	5.75	4.98	3.21
HgCl <sub>2</sub>	1.11	1.29	1.46	1.51	2.52	4.06	4.79	4.90

## CUADRO 19

Niveles de inhibición de los diferentes granos de maíz sobre alfa-amilasa -  
de bacterias pura (Fluka)

## a) Temperatura Ambiente

Grano	Valor (promedio)	Error. (promedio)	Desviación estandard
H- 28	2.14 %	± 0.76	± 1.02
Chapalote	15.34 %	± 4.06	± 5.74
F-2	14.54 %	± 2.72	± 3.87
Dulce	30.54 %	± 3.16	± 4.47
Gordo	21.92 %	± 4.68	± 6.61
Pal. Tol.	2.14 %	± 0.07	± 0.09
Cónico	7.76 %	± 0.25	± 0.34
Bofo	17.05 %	± 1.86	± 2.42
Cristalino	2.64 %	± 0.32	± 0.45
Apachito	4.83 %	± 0.09	± 0.13

## b) 70°C 10 minutos

Grano	Valor (promedio)	Error (promedio)	Desviación estandard
H-28	61.68%	± 5.80	± 9.02
Chapalote	54.31%	± 0.57	± 0.81
F-2	33.08%	± 5.94	± 8.40
Dulce	63.48%	± 5.08	± 6.87
Gordo	14.56%	± 0.31	± 0.44
Pal. Tol.	56.70%	± 6.23	± 8.81
Cónico	24.73%	± 1.15	± 1.63
Bofo	14.66%	± 1.03	± 1.45
Cristalino	19.00%	± 0.31	± 0.44
Apachito	16.25%	± 0.43	± 0.60

## CUADRO 19 (CONT.)

c)  $\text{HgCl}_2$  0.001 M.

Grano	valor (promedio)	Error (promedio)	Desviación estandard
H-28	2.57 %	± 0.88	± 1.02
Chapalote	14.89 %	± 4.03	± 5.69
F-2	7.27 %	± 1.91	± 2.70
Dulce	11.35 %	± 1.54	± 2.17
Gordo	15.85 %	± 0.33	± 0.47
Pal. Tol.	11.25 %	± 0.95	± 1.34
Cónico	9.63 %	± 0.55	± 0.78
Bofo	20.39 %	± 0.69	± 0.98
Cristalino	17.22 %	± 0.45	± 0.63
Apachito	7.91 %	± 0.13	± 0.19

## CUADRO 20

Niveles de inhibición del grano H-28 sobre las amilasas de todos los granos, a cinco días de germinación.

a) Temperatura Ambiente.

Grano	Valor (promedio)	Error (promedio)	Desviación estandard
H-28	18.29 %	± 3.54	± 5.00
Chapalote	24.95 %	± 0.34	± 0.48
F-2	17.56 %	± 2.95	± 4.15
Dulce	20.77 %	± 1.28	± 1.80
Gordo	12.54 %	± 1.51	± 2.22
Pal. Tol.	14.01 %	± 2.27	± 2.98
Cónico	12.76 %	± 1.44	± 2.03
Bofo	19.20 %	± 1.34	± 1.89
Cristalino	30.10 %	± 6.12	± 8.99
Apachito	12.51 %	± 2.55	± 3.60

b) 70°C 10 minutos.

Grano	Valor (promedio)	Error (promedio)	Desviación estandard
H- 28	50.23 %	± 0.15	± 0.21
Chapalote	64.19 %	± 5.32	± 7.52
F-2	50.60 %	± 7.30	± 9.70
Dulce	50.13 %	± 8.92	± 11.75
Gordo	78.40 %	± 5.46	± 7.72
Pal. Tol.	66.06 %	± 2.51	± 3.55
Cónico	63.03 %	± 10.52	± 14.88
Bofo	59.29 %	± 5.18	± 7.32
Cristalino	74.11 %	± 1.76	± 2.49
Apachito	81.19 %	± 2.85	± 4.03

CUADRO 20 (Cont.)

c) HgCl<sub>2</sub> 0.001 M

Grano	Valor (promedio)	Error (promedio)	Desviación estandard
H-28	48.57 %	± 2.25	± 3.18
Chapalote	38.16 %	± 8.28	± 11.71
F-2	29.37 %	± 3.34	± 4.72
Dulce	47.84 %	± 0.32	± 0.45
Gordo	38.62 %	± 7.61	± 10.76
Pal. Tol.	39.18 %	± 7.28	± 10.29
Cónico	66.99 %	± 12.79	± 18.08
Bofo	1.17 %	± 0.51	± 0.67
Cristalino	18.87 %	± 5.46	± 7.72
Apachito	22.27 %	± 4.77	± 6.74

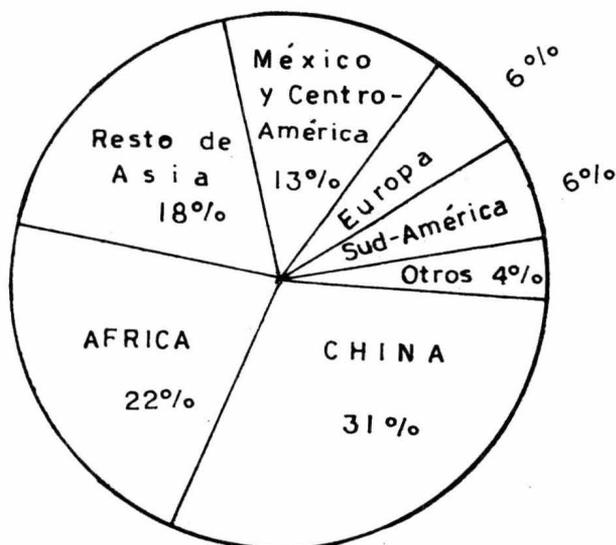


Figura 1. Utilización mundial del maíz como alimento. Promedio Anual 1964 — 1966. Total 52 millones de toneladas métricas en 132 países. (Tomado de F.A.O. 6 de 9).

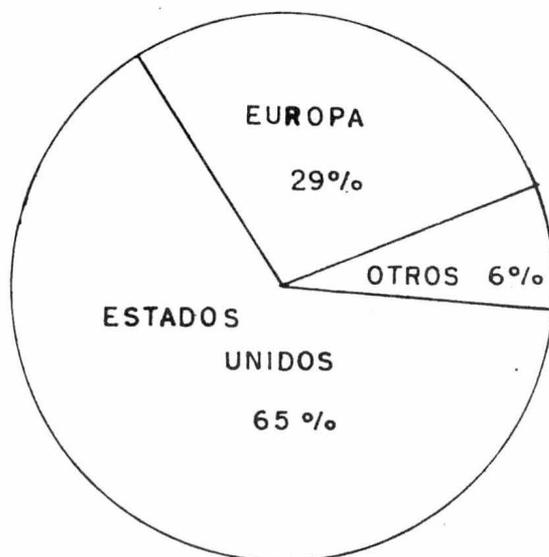


Figura 2. Utilización mundial del maíz con fines industriales. Promedio Anual 1964 — 1966. Total 96 millones de toneladas métricas. Tomado de F.A.O. (6 de 9)

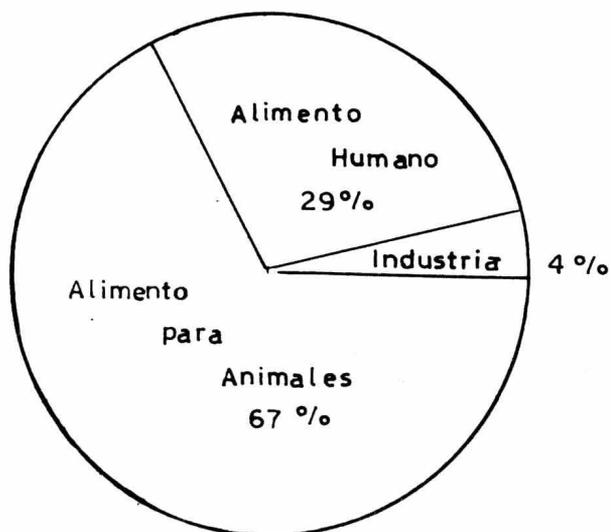


Figura 3. Utilización del maíz en todos los propósitos, eliminando el usado para siembra y las pérdidas. Promedio Anual 1964 — 1966. Total 214 millones de toneladas metricas. Tomado de F. A. O. ( 6 de 9 ).

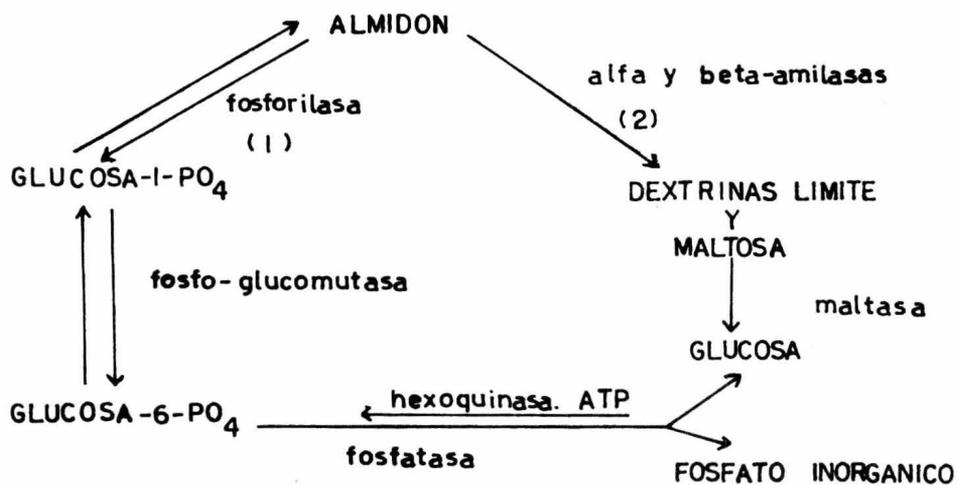
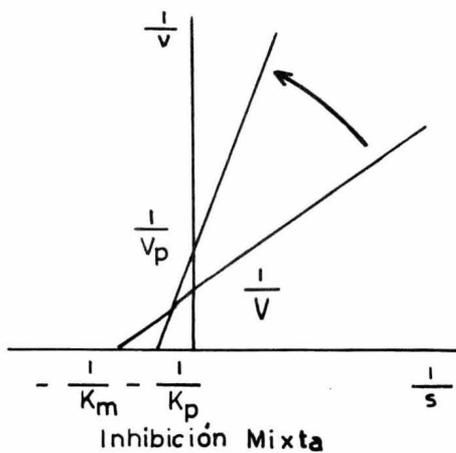
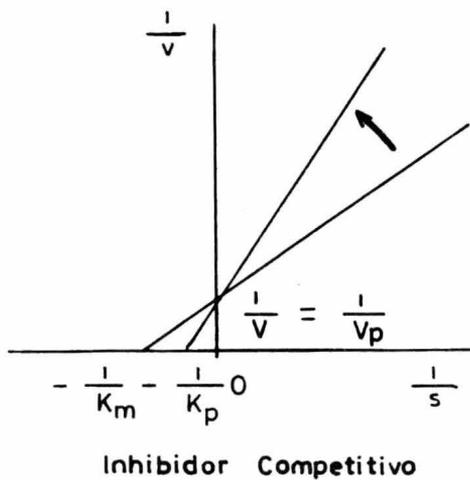
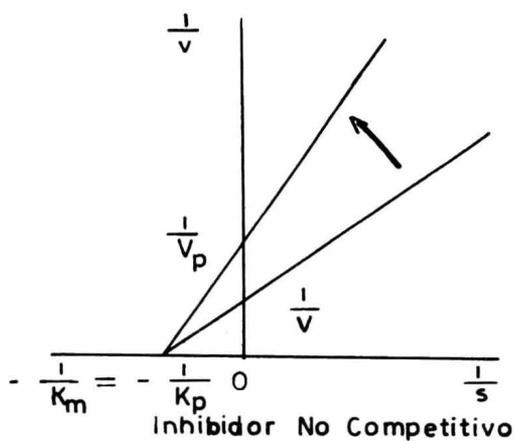


Figura 4. Digestión del Almidón.

Figura 5

Representación gráfica de los efectos inhibitorios



## B I B L I O G R A F I A

1. - García R., H. Dádivas de México al mundo.  
Ediciones especiales de Excelsior.  
(1965), 77-81
2. - Sebrell Jr., W.H. & Haggerty, J.J. Alimentos y Nutrición.  
Colección Científica de Time-Life  
México, D.F. (1974) 37-40
3. - Baker, H.G. Las Plantas y la civilización.  
Serie Fundamentos de la Botánica  
Herrero Hermanos Sucesores, S.A.  
México, D.F. (1968) 77-92
4. - Senti, F.R. & Schaefer, W.C. Corn, its importance in food, feed and industries. Cereal - Science Today.  
(Nov. 1972) Vol. 17, No. 11, 352-356
5. - Rodríguez, C.M. Característica de la Agricultura Mexicana y Proyecciones de la Demanda y Oferta de Productos Agropecuarios, a 1976-1982.  
México, D.F. (1972) 28-31
6. - Información estadística y agropecuaria.  
Estadística y producción maicera en México.  
México, D.F. (Mayo-Agosto 1972) No. 17-18, pág. 16.

7. - Labansat V., Elisa del Socorro. Diseño y preparación de una columna de afinidad para la purificación de las distintas formas de amilasas. Tesis Profesional. Fac. de Química - - U.N.A.M. (1975),
8. - Mertz, E.T. Bioquímica. Publicaciones Cultural, S.A. México, D.F. (1971) 180-183
9. - Shellenberger, J.A. Historial development of the Application of Fungan and Bacterial Enzymes to the backing industry. Cereal-Science Today (April 1971) Vol. 16, No. 4, 114-117
10. - Dixon, M. & Webb, E.C. Enzymes. Ed. Longmans. - 2a. Ed. London, Eng. (1967) 315-331
11. - Ryan, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. Annual Review of Plant Physiology (1973) 24, 176-196
12. - Kneen, E. & Sandstedt, R.M. An amylase inhibitor from certain cereals. J. Am. Chem. Soc. (1943) 65, 1247
13. - Bowman, D.E. The ether soluble fraction of navy beans en the digestion of starch. Science (1943) 98, No. 2544, 308-309.
14. - Bowman, D.E. Amylase inhibitor of navy beans. Science (1945) 102, 358-359

15. - Kneen, E. & Sandsted, R.M. Distribution and general properties of an amylase inhibitor in cereals.  
Arch. Biochem. (1946) 9, 235-249
16. - Militzer, W., Carol Ikeda, & Kneen, E. The preparation and properties of an amylase inhibitor of wheat. Arch. Biochem. (1946) 9, 309-320
17. - Militzer, W., Mode of action of an amylase inhibitor from wheat. Arch. Biochem. (1946) 9, 321-329
18. - Applebaum, S.W. The action pattern and physiological role of Tenebrio larval amylase. - J. Ins. Physiol. (1964) 10, 897-906
19. - Applebaum, S.W. & Konijn, A.M. The utilization of starch by larvae of the flour beetle, -- Tribolium castaneum. J. Nutrition (1965) 85, 275-281
20. - Jaffé, W.G. & Clara L. Vega Latte, Heath-Labile - Growth-inhibiting factors in beans - - (Phaseolus vulgaris). J. Nutrition (1968) 94, 203-210
21. - Liener, I.E. Toxic constituents of plant Foodstruffs. Academic Press. New York (1969) 429-430.
22. - Shainkin, Ruth & Yehudith Birk, Alpha-amylase inhibitors from wheat. Isolation and characterization. Biochem. et Biophys. Acta. (1970) 221, 502-513.

23. - Saunders, R.M. & Lang, J.A. Alpha-amylase inhibitors in *Triticum aestivum*: Purification and physical-chemical properties. - - Phytochemistry (1973) 12, 1237-1241
24. - Silano, V., Pocchiari, F. & Kasarda, D.F. Physical characterization of alpha-amylase inhibitors from wheat. Biochem. Biophys. Acta (1973) 317, 139-148
25. - Petrucci, Tamara, Tomasi, M., Cantagalli, P., & Silano, V. Comparison of wheat albumin inhibitors of alpha-amylase and trypsin. Phytochemistry (1974) 13, 2487-2495.
26. - Bedetti, Cecilia, Bozzini, A., Silano, V. & Vittozzi L. Amylase protein inhibitors and the role of *Aegilops* species in polyploid wheat speciation. Biochem. et Biophys. Acta (1974) 362, 299-307
27. - Silano, V., Furia, M., Gianfreda, L., Macri, A., Palescandolo, R., Pab, A., Scardi, V., Stella, E., Valfre, F. Inhibition of amylase from different origins by albumins from wheat kernel Biochem. et Biophys. Acta (1975) 391, 170-178.
28. - Buonocore, V., Elia Poerio, Gramenzi, F., & Silano, V. Affinity column purification of amylase on protein inhibitors from wheat kernel. J. of Chromatography (1975) 114, 190-114

29. - Powers, J.R. & Whitaker, J.R. Amylase Inhibitor of red Kindy beans. Plant Phys. Suppl (1975) 56, No. 2, 87
30. - Nelson, N. An photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. J. of Biol. Chem. (1944) 153, 375-382.
31. - Hopkins, R.H. & Bird, R. Action of Alpha-amylase on amylose. Biochem. J. (1954) 56, 86-95
32. - Robyt, J.F. & Whelan, W.J. Anomalous reduction of alkaline 3,5-Dinitrosalicylate by oligosaccharides and its bearing on amylase studies. Biochem. J. (1965) 95, No. 1, 10-11
33. - Sorenson, J.C. & Scandalios, J.G. Developmental expression of a catalase inhibitor in maize. Plant Physiology (1976) 57, 351-352.