

00562

6

1 ei

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UN  
INHIBIDOR DE ALFA AMILASA EN  
EL MAIZ H - 28.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)  
PRESENTA:  
ITURBE CHIÑAS FCA. AIDA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1982



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 está 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.

# I N D I C E

	PAG
RESUMEN .....	1
OBJETIVO .....	3
INTRODUCCION.....	4
DISTRIBUCION Y FUNCION DE LOS INHIBIDORES DE- ENZIMAS HIDROLITICAS .....	4
DETECCION Y ENSAYO DE- LOS INHIBIDORES DE al- fa-AMILASA .....	9
DISTRIBUCION DE LOS -- INHIBIDORES DE alfa--- AMILASA EN LA PLANTA .....	12
PROPIEDADES DE LOS --- INHIBIDORES DE alfa--- AMILASA .....	13
PROPIEDADES GENERALES .....	13
ESPECIFICIDAD .....	23
INHIBIDORES DE alfa-AMILASA EN TRIGO .....	27
INHIBIDORES DE alfa-AMILASA EN <u>Phaseolus vulgaris</u> .....	36
EFECTOS FISIOLÓGICOS Y SIGNIFICANCIA NUTRICIO NAL DE LOS INHIBIDORES DE alfa-AMILASA .....	41
MATERIALES Y METODOS .....	52
MATERIALES .....	54
METODOS .....	54
PURIFICACION .....	54
ACTIVIDAD INHIBITORIA .....	55
DETERMINACION DE PROTEINAS ..	58

CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS ..	58
DETERMINACION DE PESO MOLE CULAR .....	59
ELECTROFORESIS EN GELES .....	60
ACTIVIDAD PROTEOLITICA .....	61
DIGESTION CON PROTEASAS .....	61
RESULTADOS .....	63
PURIFICACION .....	64
NATURALEZA PROTEICA .....	77
CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS .....	79
PESO MOLECULAR .....	79
ELECTROFORESIS EN POLIACRILA MIDA .....	80
EFECTO DE LA TEMPERATURA .....	83
REQUERIMIENTOS DE PREINCUBA CION .....	88
ACTIVIDAD PROTEOLITICA .....	95
TIPO DE INHIBICION .....	96
ESPECIFICIDAD .....	97
DISCUSION .....	109
BIBLIOGRAFIA .....	113

## T A B L A S

Tabla no. 1.-	Inhibidores de enzimas hidrolíticas	7
Tabla no. 2.-	Solubilidad del inhibidor de amilasas presente en el maíz H-28	65
Tabla no. 3.-	Precipitación del inhibidor de amilasas presente en el maíz H.-28 con sulfato de amonio	66
Tabla no. 4.-	Purificación del inhibidor de amilasas	88
Tabla no. 5.-	Efecto del pretratamiento térmico del inhibidor de alfa-amilasa aislado del maíz H-28	89
Tabla no. 6.-	Efecto de la preincubación de alfa-amilasa de <u>Tribolium castaneum</u> con el inhibidor de amilasas presente en el maíz H-28	92
Tabla no. 7.-	Especificidad de la inhibición de diferentes amilasas por el maíz H-28.	106

## F I G U R A S

Figura No. 1.-	Precipitación con sulfato de amonio.	67
Figura No. 2.-	Cromatografía en Sephadex G-75.	70
Figura No. 3.-	Peso molecular en Sephadex G-75.	72
Figura No. 4.-	Cromatografía en Sephadex G-150.	74
Figura No. 5.-	Purificación del inhibidor de amilasas presente en el maíz H-28.	76
Figura No. 6.-	Peso molecular por electroforesis en poliacrilamida con S.D.S.	81
Figura No. 7.-	Electroforesis en poliacrilamida y elusión de la actividad.	84
Figura No. 8.-	Electroforesis preparativa en poliacrilamida.	86
Figura No. 9.-	Efecto de la temperatura.	90
Figura No. 10.-	Preincubación del inhibidor del maíz H-28 con amilasa de insecto.	93
Figura No. 11.-	Efecto del inhibidor de maíz sobre la actividad de amilasa de <u>Tribolium castaneum</u> .	98
Figura No. 12.-	Representación de Lineweaver-Burk del efecto del inhibidor de maíz sobre amilasa de insecto.	100
Figura No. 13.-	Regrafica del efecto del inhibidor de maíz sobre amilasa de insecto.	102
Figura No. 14.-	Inhibición relativa de las amilasas sensibles.	107

## R E S U M E N

Se detectó la presencia de un inhibidor de alfa--amilasa en semillas de maíz. Este inhibidor se comporta co--mo una proteína y puede ser extraído con una solución de --cloruro de sodio y precipitado con sulfato de amonio a 60%--de saturación. Sus propiedades difieren de aquellas repor--tadas para otros inhibidores de alfa-amilasa también de na--turaleza proteínica presente en otros vegetales. Así, por--ejemplo, es capaz de inhibir tanto las propias amilasas del--grano producidas durante germinación, como alfa-amilasa de--bacterias. El inhibidor es también activo frente a las ami--lasas de los insectos Tribolium castaneum (escarabajo rojo--de los granos), Sitophilus zeamais (gorgojo del maíz) y - -Rhizopertha dominica (horador menor de los granos), pero--es inactivo contra alfa-amilasa de saliva humana, alfa-ami--lasa pancreática de porcino, alfa-amilasa de Aspergillus --oryzae, amilasas de trigo, cebada, centeno, triticale y sor--go. El inhibidor de amilasas fue purificado hasta homoge--neidad de maíz H-28 por filtración en Sephadex G-75 y G-150. Mostró poseer un peso molecular aparente de 29 600 D y no - contener ningún componente de tipo carbohidrato. Es esta--ble cuando se le calienta a 96°C por 5 min. a pH 7.0. Para obtener máxima inhibición se requieren cuando menos 10 min. de preincubación de la enzima con el inhibidor. Por elec--troforesis en geles de poliacrilamida mostró tres diferentes

bandas proteicas activas. Sin embargo, cuando la electroforesis es llevada a cabo en presencia de SDS y mercaptoetanol, sólo se obtiene una banda proteica. Presenta inhibición de tipo incompetitivo frente a alfa-amilasa del insecto Tribolium castaneum mostrando una  $K_i$  de  $7.117 \times 10^{-9}$  M.



## O B J E T I V O

En investigaciones anteriormente realizadas en el Laboratorio de Bioquímica de la División de Estudios Superiores de la Facultad de Química de la U.N.A.M., se había mostrado la presencia de factores antimilolíticos en algunas variedades de maíz (Iturbe-Ch., F. A. 1976), esta actividad se mostró frente a preparaciones amilolíticas bacterianas y del propio grano en germinación. Estos resultados sugirieron la posibilidad de atribuir a dichos factores antienzimáticos papeles fisiológicos dentro del control del metabolismo del almidón en la propia planta, además de estudiar su relación con otras amilasas para definir la posibilidad de involucrarseles en mecanismos de defensa de la planta frente a infestaciones principalmente de bacterias e insectos. Así mismo pareció relevante estudiar su posible papel antinutricional para los animales y el hombre que lo consumen.

El presente trabajo, tuvo como objetivo la purificación y caracterización bioquímica de la sustancia presente en el maíz H-28, responsable de inhibir la actividad de alfa-amilasa, de tal manera que basándose en sus propiedades, se pueden postular mecanismos de acción en la regulación del metabolismo de almidón, tanto en el grano mismo como en los organismos que lo consumen.

## I N T R O D U C C I O N

La presencia de inhibidores enzimáticos en plantas, principalmente en aquellas usadas como alimentos, ha sido el tema de numerosas investigaciones. Estos estudios se han enfocado desde diversos puntos de vista, así, se les han atribuido papeles fisiológicos en la regulación del metabolismo interno de las plantas, o bien, un papel defensivo contra infestaciones por insectos, o como factor antinutricional para el consumo por humanos y animales útiles al hombre.

### DISTRIBUCION Y FUNCION DE LOS INHIBIDORES DE ENZIMAS HIDROLITICAS

Muchas plantas contienen sustancias que inhiben la acción enzimática, estas sustancias son en su gran mayoría inhibidores de enzimas hidrolíticas. En la Tabla No. 1 se muestran algunos reportes de inhibidores de proteasas, ribonucleasas, invertasas, poligalacturonasas, celulasas y alfa-amilasas obtenidos de plantas. Estos inhibidores son de dos tipos principales - aquellos que son proteínas y son específicos para enzimas particulares, y los no proteicos, usualmente de naturaleza polifenólica o taninos. Los inhibidores del último tipo son mucho menos específicos e inhiben a un gran número de diferentes enzimas.

Los inhibidores protéicos de enzimas proteolíticas han sido aislados de muchas plantas, y su química ha sido examinada en detalle. La estructura primaria de algunos inhibidores ya es conocida, se han postulado mecanismos de acción probables, y la naturaleza de la interacción proteasa-inhibidor se ha examinado por cristalografía de rayos "X". Aún no se han establecido en forma inequívoca los papeles de los inhibidores de proteasas; posiblemente participan en la regulación de la actividad proteolítica de las plantas, la protección de las plantas contra el ataque de los microorganismos o la depredación por insectos, o bien tengan un papel como proteínas de reserva (Rayan, C. A. 1973).

Los inhibidores de otras enzimas hidrolíticas han sido examinados en mucho menos detalle que los inhibidores de proteasas. Los inhibidores de invertasas, los cuales son proteínas, probablemente sirven como reguladores de la hidrólisis de sacarosa en la planta: esto podría asegurarse debido a que ellos inhiben las invertasas correspondientes (Pressey, R. 1967). Se ha sugerido que los inhibidores de poligalacturonasas, que también son proteínas, están involucrados en la protección de la planta contra patógenos, los cuales usualmente entran a la planta rompiendo las paredes celulares por acción de las enzimas pécticas (Fisher, M. L. y colaboradores 1971). Los inhibidores de celulasas son, aparentemente sin excepción, polifenoles y pueden jugar un

papel en la protección del material estructural de las plantas contra la degradación de microorganismo celulolíticos. - Es probable que también actúen inhibiendo las enzimas celulolíticas de los microorganismos de los rumiantes, de tal manera que dichos inhibidores pueden tener un efecto indeseable en el crecimiento característico de los animales que se alimentan con materiales ricos en dichos inhibidores (Maddels, M. y Reese, E.T. 1965). Existe sólo un reporte de un inhibidor de ribonucleasas en plantas. Se ha sugerido que este inhibidor es proteico y su función "in vivo" se desconoce (Bernheimer, A.W. y Steele, J. M. 1955).

Los inhibidores de alfa-amilasa que se encuentran naturalmente en las plantas o son producidos por microorganismos pueden ser compuestos de bajo peso molecular o ser macromoléculas. Los inhibidores de bajo peso molecular incluyen ácido salicílico (Hemberg, T. y Larsson, I. 1961), ácido abscisico (Hemberg, T. 1975), un antibiótico denominado nojmicina (Niwa, T. y colaboradores 1970), oligo y polisacáridos de peso molecular 500 a 8000 D producidos por ciertas líneas de Streptomyces, Ampullariella y Actinoplanes (Frommer, W. et al 1972).

Entre los inhibidores de alto peso molecular hay inactivadores de enzimas así como inhibidores proteicos altamente específicos. Los inhibidores de alfa-amilasa de natu

TABLA No. 1.- Inhibidores de enzimas hidrolíticas.

ENZIMA	FUENTE DEL INHIBIDOR	NATURALEZA
Proteasas	Varias plantas	Proteína
Invertasas	papa Maíz Petalos de <u>Ipomoea</u>	Proteína
Poligalacturonasa	Hipocotilo de frijol Brotos de tomate Celulas de Sicomoro en cultivo	Proteína
Celulasas	Varias plantas	Polifenol
Ribonucleasas	Hojas de Lila	Posiblemen te proteí- na.
Alfa-amilasas	Varias plantas	Proteína, otras molé culas.

raleza proteica no sólo estan presentes en especies genéticamente relacionadas como trigo (Kneen, E. y Sandstedt, R.M 1943), cebada (Strumeyer, D. H. 1972), y avena (Elliot, B.B y Leopold, A. C. 1953), sino en otras especies no relacionadas como frijol (Bowman, D.E. 1943), Colocasia esculenta -- (Rao, M.N. y colaboradores 1967) y platanos y mangos (Matto A.K. y Modi, V.V. 1970).

Al igual que los inhibidores de proteasas, los inhibidores de alfa-amilasa parecen estar ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y debido a su capacidad de inactivar alfa-amilasa "in vivo", pueden tener una significancia nutricional considerable. Por esta razón, se ha dado mucha atención a estos inhibidores. Su función en las plantas no es conocida con certeza, sin embargo, consideraciones sobre la especificidad de los inhibidores ("vide infra") sugieren que pueden servir como protección de las semillas en las -- cuales se encuentran en contra de la depredación por insectos y animales, debido a su capacidad de inhibir las enzimas amilolíticas digestivas de los depredadores (Marshall, J.J. 1975c).

La relación entre las plantas y los insectos y entre las plantas y los microorganismos muy compleja y la multiplicidad de enzimas e inhibidores complica aún más el panorama. En 1973 Rayan mencionó que cuando un insecto ata

ca una hoja de una 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 parece, el papel de los inhibidores enzimáticos en plantas no es pasivo.

La presencia de inhibidores enzimáticos en plantas que los insectos utilizan como alimento, puede esperarse -- que tenga efectos significativos en la nutrición de éstos -- Si estas plagas continúan ingiriendo los alimentos que contienen al inhibidor, su organismo puede tener serios problemas. Por ejemplo, no podrán degradar proteínas y utilizarlos aminoácidos liberados en la síntesis de proteínas, si se trata de inhibidores de proteasas; no tendrán suficiente energía a partir de almidón, si se trata de inhibidores de amilasas; etc., el resultado será una interferencia en el metabolismo normal que los lleve a un mal desarrollo e incluso a la muerte. Desde este punto de vista, los inhibidores enzimáticos pueden tener gran valor en los tejidos de las plantas como material de protección de los componentes de la misma, principalmente de los materiales de reserva.

#### DETECCION Y ENSAYO DE LOS INHIBIDORES DE Alfa-AMILASA.

Comparando los progresos en el estudio de los inhi-

bidores de proteasas y los inhibidores de amilasas, Fossum, K. y Whitaker, J. R. (1974) presentaron un trabajo en que describen un método simple para detectar los inhibidores de amilasas, ya que consideran que los retrasos en la investigación de estas sustancias, tanto nutricionalmente como bioquímicamente se debe en parte a la falta de métodos sencillos para detectar a estos inhibidores. Este método se basa en la difusión de soluciones de amilasa y del inhibidor en placas de agar conteniendo almidón, y el revelado de las zonas de digestión amilolítica con yodo. Este método puede ser semicuantitativo, cuando se miden las superficies de difusión de la amilasa remanente después de interaccionar con el extracto inhibidor estudiado, cuando se coloca la mezcla en pequeños orificios en la placa de agar-almidón. Cuando se usa este método en forma cualitativa únicamente, se puede estudiar varios extractos inhibitorios y varias amilasas al mismo tiempo, ya que lo que se hace, es colocar en la placa de agar-almidón tiras de papel filtro embebidas del extracto por estudiar colocadas en forma paralela y después de algún tiempo, se remueven y se colocan en forma perpendicular a las primeras varias tiras de papel filtro embebidos esta vez con la solución de amilasas que se desea probar. de esta manera, se pueden observar, después de revelar con yodo, zonas en que el almidón fue digerido cuando la solución no contiene inhibidor y zonas con el almidón integro o



ligeramente digerido cuando el extracto estudiado contenía-inhibidor.

Preocupados por las grandes diferencias en la expresión de la actividad inhibitoria de los inhibidores de -amilasas encontrados principalmente en cereales y leguminosas, Marshall, J.J. y Lauda, C.M. (1975a), estudian la dependencia de la actividad inhibitoria a la temperatura y el tiempo de preincubación del inhibidor purificado de Phaseolus vulgaris, al que denominan "Faseolamina", y la amilasa pancreática de porcino, encontrando que cuando la preincubación se llevaba a cabo a 0°C la inhibición mostrada era menor que cuando la preincubación se llevaba a cabo a 25°C. - En cuanto al tiempo de preincubación, recomiendan que, aunando a la cantidad de inhibidor, sea tal que no se inhiba más del 50% de la actividad amilolítica inicial de la preparación, ya que sólo en estas condiciones la inhibición es -proporcional a la cantidad de inhibidor. También estudiaron el pH óptimo de preincubación como un factor importante en la actividad inhibitoria observada y encontraron que para su inhibidor (la faseolamina), frente a amilasa pancreática, el pH al que debe hacerse la preincubación debe ser de 5.5, que difiere grandemente con 6.9 que es el pH óptimo para la actividad enzi-

mática. En este trabajo, basandose en sus resultados, proponen un método para medir la actividad inhibitoria frente a alfa-amilasa. Ellos recomiendan que la cantidad de enzima por estudiar sea tal que la enzima sin inhibidor disminuya la tinción de yodo del sustrato en el intervalo en que es lineal con el tiempo (65% de decremento). La cantidad de inhibidor y la duración del periodo de preincubación deben ser tales que no se inhiba más del 50% de la actividad amilolítica.

#### DISTRIBUCION DE LOS INHIBIDORES DE Alfa-AMILASA EN LA PLANTA.

Hasta donde se sabe, los inhibidores de alfa-amilasa de naturaleza proteica sólo han sido encontrados en la planta asociados con el endospermo almidonoso.

Después de su primera comunicación de 1943, Kneen, E. y Sandstedt, R. M. (1964), se dedicaron a estudiar la -- distribución y propiedades generales del inhibidor de amilasa encontrando en trigo y centeno. Reportaron la presencia del inhibidor de amilasa salival y pancreática, localizado en el endospermo del trigo maduro, estudiando su presencia en diferentes estadios de la maduración del grano, sin en--

contrarlo en ninguna de las etapas inmaduras, aparentemente este inhibidor aparece cerca del estadio que coincide con la obtención del aspecto maduro, o muy cerca de éste, presentándose 15 días después de la floración. Al determinar la presencia del inhibidor al hacer germinar al grano de trigo, encontraron que cuando tenía retoños de 12' a 14 mm, aún se conservaba la actividad inhibitoria, llegando a inhibir el 78.5% de la actividad amilolítica. Estos autores propusieron entonces, que el hecho de que se mantenga la actividad inhibitoria y no varíe en concentración durante la germinación parecía tener grandes implicaciones metabólicas.

#### PROPIEDADES DE LOS INHIBIDORES DE Alfa- AMILASA.

PROPIEDADES GENERALES.- Los inhibidores de alfa-amilasa han sido conocidos desde hace mucho tiempo (1938)- pero comparados con los inhibidores de proteasas, se sabe muy poco de sus estructuras y mecanismos de acción, su significancia nutricional, o su papel "in vivo".

Como se mencionó anteriormente, se han descubierto inhibidores de alfa-amilasa proteicos y no proteicos.

Con respecto a algunos inhibidores de los que se desconocen su naturaleza, tenemos que, el estudio de inhi-

bidores de la actividad amilolítica ha sido reportado desde 1938, en que los investigadores rusos I. E. Sukhorukov. y -colaboradores (1938), encontraron que en la papa existen inhibidores de amilasas y su presencia está relacionada con la resistencia de los tuberculos a ser infestados por Phytophthora infestans, de tal manera que las variedades de papa resistentes contienen mayor cantidad del inhibidor. Además la presencia del inhibidor aparentemente impedía el desarrollo de otros microorganismos.

En octubre de 1943, Bowman, D.E. reportó que durante experimentos relacionados con la digestibilidad del frijol observó que el aceite del frijol retardaba la digestión del almidón soluble por amilasa pancreática. Al compararse este efecto con el de otras grasas, encontró que la influencia retardante del aceite de frijol era mucho mayor que la que tenían la manteca, el aceite de oliva y la mantequilla. Este efecto inhibitorio era eliminado por tratamiento del aceite con levaduras o calentando la preparación a 100°C durante 30 min. así mismo, el calentamiento de los frijoles con ácido diluido y la subsecuente neutralización prevenía la incompleta digestión del almidón.

Por último, Stankovic, S.C. y Markovic, M.D. (1963) reportan el estudio de inhibidores de amilasas presente en bellotas. Estos autores estudiarón la acción de un inhibi-

dor de amilasas de Quercus penculata sobre la hidrólisis enzimática de azúcares y la fermentación alcohólica de mezclas de harina de trigo y extractos de bellotas, comparando la acción inhibitoria de los extractos de bellotas sobre la acción diastásica y la fermentación de preparaciones de harina de cebada. La fermentación de harinas de cebada fue menos inhibida que la actividad diastasa, por lo que sugirieron la existencia de factores protectores en la primera. Estos autores encontraron también, que estos extractos de bellotas inhibían más fuertemente beta-amilasa que alfa-amilasa, y que el efecto sobre la fermentación alcohólica era muy ligero, en tanto que en la hidrólisis de azúcares el efecto era mayor.

De estos tres inhibidores se desconoce hasta el momento su naturaleza química y se propone que interfieran con la acción amilolítica por interacción directa con el sustrato mejor que con la enzima. Ninguna de estas sustancias pueden entonces ser consideradas verdaderos inhibidores de amilasas.

Murao, S. y Ohyama, K. (1975), reportaron por primera vez la existencia de un inhibidor de amilasas producida por un microorganismo, describiendo el procedimiento de purificación y algunas de las propiedades. El microorganismo del cual aislan al inhibidor es Streptomyces diastaticus

var amilostaticus. Esta purificación la realizan bajando el pH del medio de cultivo a 3.0 y absorbiendo al inhibidor en carbón activado, para después eluirlo con etanol al 60%. Esta fracción cruda del inhibidor la hicieron reaccionar con alfa-amilasa bacteriana para formar un complejo que separaron por cromatografía de filtración en Sephadex G-75, este complejo es precipitable con acetona al 66%, luego fue redisolto y al ajustar el pH a 1.8 lograrón disociarlo y desactivar a la amilasa, de esta manera, después de ajustar el pH a 5.4 obtienen purificado al inhibidor que denominan S-A<sub>1</sub>. La homogeneidad del inhibidor fue probada por cromatografía en capa fina con alumina. Estos autores examinaron el efecto de este inhibidor frente a varias hidrolasas glucosídicas, encontrando que sólo es capaz de inhibir alfa-amilasas y glucoamilasa, siendo incapaz de inhibir beta-amilasa, isoamilasas, alfa-glucosidasa, dextranasa, celulasa, laminalinasa y beta-glucosidasa. Además, encontraron que beta-amilasa era capaz de hidrolizar al inhibidor. Al analizar su composición, encontraron que el inhibidor es un oligosacarido con 80 - 85% de glucosa, en enlaces 1 - 4 y, debido a la acción de beta-amilasa sobre el, presenta cuando menos cuatro enlaces glucosídicos en posición alfa. Este inhibidor resultó ser una sustancia muy estable que mantuvo el 100% de su actividad antiamilolítica aún después de ser calentado a 100°C por 30 min. en un intervalo de pH de 3.0 a 10.5. Se le estimó un peso molecular de 1 500 D, se

gún los datos de filtración en geles de Sephadex y Biogel.

Entre los últimos reportes sobre los inhibidores de alfa-amilasa, se encuentra uno de Ueda, S. y colaboradores (1978) en que analizan la acción del inhibidor de amilasas producido por Streptomyces sp. Sobre algunas carbohidrasas y fosforilasas. Estos autores encontraron cuatro tipos de inhibidores, los cuales mostraron pesos moleculares relativamente pequeños (1 300 a 4 000 D), siendo todos glucoproteínas. La purificación la llevaron a cabo por cromatografía de intercambio iónico en columnas de Dowex. Los cuatro inhibidores encontrados mostraron diferentes actividades frente a las enzimas estudiadas, inhibiendo principalmente a las enzimas que tienen como sustrato al almidón y amilosa, como son fosforilasa A de músculo, alfa-D-glucosidasa de levadura y de Mucor y cicloamilosa glicosiltransferasa, además de alfa-amilasa de Rhizopus sp.

El inhibidor del sorgo ha sido el mejor caracterizado, entre los inhibidores no proteícos. Así, Miller, B y Kneen, E. en 1947, reportaron la presencia de un inhibidor de amilasas en sorgo, encontrando algunas propiedades y su modo de acción. Reportaron la incidencia del inhibidor en varios sorgos y el procedimiento de purificación. Entre algunas de las propiedades encontraron que se precipita con soluciones básicas de acetona, alcohol etílico, alcohol iso

propílico y cloruro de calcio, pero, en todos los casos resultó ser soluble en las soluciones ácidas. Resultó ser -- tan estable a la temperatura que permaneció activo después de someterse a autoclave durante 30 min a 15 libras de -- presión, también fue estable en ácido clorhídrico e hidroxido de sodio IN. Sin embargo, el inhibidor fue inactivado -- al calentarse en presencia de sulfito de sodio, pero no -- se mostró afectado cuando se le calentó con clorito de so-- dio. Esta sustancia inhibitoria fue capaz de atravesar mem-- branas de dialisis comunes y podía ser recuperado después -- de la dialisis con agua destilada. En relación al modo de -- acción, encontraron que la inhibición era reversible, esto -- parecia ser resultado de absorción física y no debido a -- reacción química, ya que el tratamiento con peptona y otras -- sustancias biológicas era capaz de inactivar al inhibidor. El inhibidor parcialmente purificado dió pruebas positivas -- para indoles y mostró un contenido de 2.6% de nitrógeno. -- Los autores concluyen que este inhibidor presente un sorgo -- parece ser un ácido orgánico de peso molecular relativamen-- te alto que contiene al grupo indol y no tiene nitrógeno -- amígeno.

Strumeyer, D.H. y Malin, M.J. (1969), reinicián -- después de 22 años, el estudio del inhibidor de amilasas -- presente en sorgo reportando un procedimiento de aislamien-- to y la caracterización, además de la interacción con otras



enzimas. La purificación la llevan a cabo de la fracción correspondiente al germen de la semilla, la cual desgrasan y extraen con etanol al 95%, con este procedimiento lograron la total disolución del inhibidor sin solubilizar sustancias que interferían y contaminaban las preparaciones. La solución etanolica era después concentrada y aplicada a una columna de Sephadex LH-20 en la que era retenida fuertemente la actividad inhibitoria, que fue eluida con acetona acuosa al 50%. Esta preparación fue después liofilizada y así obtuvieron un polvo rojo-café al que consideraron el inhibidor purificado. Probaron la actividad inhibitoria frente a alfa-amilasas pancreática y bacteriana, así como frente a una preparación altamente purificada de alfa-amilasa de malta de cebada, mostrando en todos los casos, completa inhibición a medida que se aumentaba la cantidad de inhibidor. Cuando estudiaron la especificidad de la inhibición observaron un comportamiento indiscriminado de este material, ya que fue capaz de inhibir enzimas tan diferentes como pectin-metil esterasa, poligalacturonasa y ribulosa difosfato carboxilasa. Entre las propiedades químicas que le encuentran, estan la solubilidad en metanol, etanol, acetona acuosa, dimetilformamida, ácido acético acuoso, hidróxido de sodio 5M y agua, resultando completamente insoluble en acetona, éter, piridina y benceno. La sustancia aislada no contenía ni azufre ni nitrógeno. En estudios espectroscópicos, mostraron la presencia de grupos fenólicos. Al --

adicionarle geltaína al 1% se precipitaba la actividad inhibitoria, siendo esta prueba específica para taninos, y resultando consistente con la estructura polifenólica encontrada. Por medio de otras pruebas, demuestran la presencia de grupos cianidina que indicaban una naturaleza leucocianidina, lo que la hacía un antagonista natural de enzimas. Estos autores concluyen que la sustancia presente en sorgo es un desnaturalizante de proteínas, capaz de inactivar una gran cantidad de enzimas.

Las propiedades del inhibidor del sorgo contrastan con aquellas proteínas inhibitoras de amilasas, ya que estas son específicas para alfa-amilasas, no dializables y pueden ser inactivadas con calentamiento. Los inhibidores proteícos de alfa-amilasas si bien son susceptibles a inactivación con calor; generalmente son proteínas termoestables, frecuentemente requieren prolongado calentamiento a temperaturas elevadas, e incluso, autoclave, para destruir su actividad completamente .

De todos los inhibidores proteícos de alfa-amilasa que han sido aislados de plantas, el mejor conocido es el de trigo, primeramente estudiado por Kneen y colaboradores (Kneen, E. y Sandstedt, R.M. 1943, 1946) en los 40's, sin embargo, el inhibidor de centeno (Kneen, E. y Sands---

tedt, R. M. 1943 - 1946) y de frijoles (Bowman, D. E. 1945) fueron detectados primeramente aproximadamente al mismo --- tiempo.

Otros inhibidores de tipo proteínico, menos estudiados, son los encontrados por Rao, M.N. y colaboradores - en 1967 en Colocasia esculenta (una raíz comestible) y Ma---ttoo, A. K. y Modi, V.V. en 1970 en mangos y platanos inma---duros. Con respecto al primero tenemos que cuando Rao y co---laboradores colocaron harina de la raíz con una preparación de saliva humana, no obsrvaron la degradación de los granu---los de almidón. Al hacer un extracto acuoso de dicha hari---na observaron el mismo efecto, por lo que concluyeron que la sustancia inhibitoria es soluble en agua. Encontraron que---este inhibidor fue estable a la temperatura de ebullición - del agua y debido a esta característica y la termolabilidad de las amilasas, pudieron eliminar la actividad amilolítica de sus preparaciones, ya que observaron que esta actividad---enzimática en general reducía la efectividad del inhibidor. Al estudiar la selectividad del inhibidor frente a algunas---preparaciones amilolíticas encontraron que los extractos de Colocasia inhibían selectivamente la amilasa salival. ---Otras de las propiedades que encontraron fueron la capaci---dad de retenerse en membranas de dialisis y poder ser preci---pitado por los compuestos usuales para precipitar proteí---nas.

En cuanto al inhibidor encontrado en planos y mangos inmaduros, tenemos que en 1970, Mattoo, A. K. y Modi, - V.V. reportaron la purificación parcial y algunas propiedades de algunos inhibidores enzimáticos, entre los que se encontraban el inhibidor de peroxidasa, de catalasa y el de amilasas. En cuanto a este último, lo lograron purificar - 100 veces cuando la fuente de obtención fueron mangos inmaduros. Una característica común a los inhibidores estudiados fue su termolabilidad, la incapacidad de cruzar membranas para diálisis y su naturaleza proteica. La purificación del inhibidor de amilasas la llevaron a cabo por  cromatografía de intercambio iónico. En el caso del inhibidor de amilasas de mango inmaduro cuando la determinación se -- realizó frente a la amilasa del mismo mango, encontraron -- que la inhibición fue de tipo competitivo. Las características del inhibidor de amilasas y las enzimas presentes en los platanos inmaduros parecen ser similares a las de las -- encontradas en los mangos inmaduros.

Las propiedades de los inhibidores de trigo, centeno y frijol serán descritas con mayor detalle en seccio-

nes posteriores.

#### ESPECIFICIDAD DE LOS INHIBIDORES DE ALFA-AMILASA.

de los inhibidores de alfa-amilasa de naturaleza proteica - sólo se ha reportado uno que fue capaz de inhibir enzimas - diferentes a alfa-amilasa. Una preparación de frijol que - inhibiatripsina (Bowman, D.E. 1945), pero esta actividad -- probablemente fue debida a contaminación con un inhibidor - de tripsina específico, también presente en los frijoles es - tudiados. Sin embargo, ya que los inhibidores de tripsina - en el trigo parecían representar un cierto porcentaje de -- las proteínas solubles en las que se encontraban los inhi - bidores de alfa-amilasa Petrucci, T. y colaboradores en -- 1974, compararon los inhibidores de alfa-amilasa y los de trip - sina presentes en trigo para investigar sus posibles corre - laciones. Estos investigadores encontraron por filtración - en gel 5 fracciones albuminoideas, de éstas, sólo 3 fueron - activas inhibiendo alfa-amilasa de insectos, sólo una inhi - bio alfa-amilasas pancreática y salival además. Dos de las fracciones con actividad antiamilolítica también presenta - ron actividad antitriptica, pero al ser sometidas a electro - foresis cada fracción mostró dos componentes diferentes. - A pH 8.5 las proteínas que inhibían alfa-amilasa migraron - hacia el ánodo, en tanto que las que inhibían tripsina lo - nicieron hacia el cátodo .(Petrucci, T. y colaboradores --- 1974).

Las alfa-amilasas de diferentes orígenes muestran diferencias en la susceptibilidad a inhibición por inhibidores de alfa-amilasa específicos, además, estos inhibidores no tienen todos la misma especificidad. Como se indicó anteriormente, el inhibidor encontrado en Colocasia esculenta (Rao, M.N. y colaboradores 1967) inhibe selectivamente alfa-amilasa salival y es el que presenta la especificidad más simple, Kneen, E. y Sandstedt, R.M. en 1943 reportaron que el inhibidor que encontraron en trigo inhibía fuertemente la alfa-amilasa salival, la pancreática y algunas amilasas bacterianas, principalmente las de tipo sacarificante, en tanto que las amilasas bacterianas de tipo liquificante, las amilasas de algunos hongos y las de cereales malteados, resultaron ser resistentes a la inhibición.

En 1964 Applebaum, S.W. y en 1965 Applebaum, S.W. y Könijn, A.M. estudiaron el efecto "in vivo" del inhibidor de alfa-amilasas encontrado en el trigo, con larvas de los insectos Tribolium castaneum y Tenebrio molitor encontrando fuerte interferencia en el metabolismo del almidón de estos insectos. Este hecho, aunado al trabajo "in vivo" de Shaikin, R. y Birk, Y. en 1965 y 1970 demostraron que el inhibidor de alfa-amilasa presente en trigo también es capaz de inhibir las amilasas de estos insectos.

Shaikin, R. y Birk, Y. (1965 y 1970) además en--

contraron que de las dos formas de inhibidor que detectan, una inhibe unicamente las amilasas de los insectos, en tanto que la otra además inhibe las alfa-amilasas salival y -- pancreática.

Silano, V. y colaboradores (1975) probaron la --- inhibición que producían las albuminas del trigo sobre amilasas de diferentes orígenes estudiando 17 extractos acu-- sos con actividad amilolítica proveniente de insectos, 23 - de especies marinas, 18 de aves y mamíferos, algunos cereales y las propias amilasas del trigo en diferentes estadios de maduración. Determinaron la inhibición de las amilasas de estos extractos causada por tres fracciones albuminoideas presentes en trigo, las preparaciones amilolíticas fueron divididas en susceptibles, parcialmente susceptibles y resistentes de acuerdo con el número de fracciones que eran capaces de inhibirlas. Así, las amilasas susceptibles fueron inhibidas por las tres fracciones, quedando dentro de éstas la mayoría de las amilasas de los insectos que atacan al trigo y las amilasas de algunas especies marinas. Las amilasas parcialmente susceptibles, inhibidas por una o dos fracciones, fueron las de algunas aves y mamíferos, incluyendo al hombre. Por último, 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 del -

trigo fueron inhibidas las amilasas del propio grano.

En frijol, Jaffé, W.G. y colaboradores (1973), -- analizaron la inhibición de diferentes amilasas, mostrando que el inhibidor presente en las leguminosas, principalmente en frijoles y soya, inhibe fuertemente las amilasas pancreática porcina y salival humana, en tanto que las amilasas de Bacillus subtilis resultaron poco afectadas y las amilasas de malta, soya y frijol no fueron afectadas. Por otro lado, Marshall, J.J. y Lauda, C.M. (1975b) encontraron que el inhibidor presente en frijol al que denominaron faseolamina, resulto ser específico para amilasas animales, -- no teniendo actividad frente a las amilasas bacterianas, -- fungicas y vegetales correspondientes. Por último, Powers, J. R. y Whitaker, J. R. (1977a) encontraron que la especificidad de la inhibición de la glucoproteína encontrada en -- frijol, se mostró principalmente frente a las alfa-amilasas pancreática porcina, salival humana y del insecto Tenebrio molitor, y a pesar de que encuentran actividad inhibitoria frente a una preparación de alfa-amilasa de malta comercial consideran que las alfa-amilasas de cebada, B. subtilis, Aspergillus oryzae y beta-amilasa de cebada no son afectadas.

Como único reporte en que el inhibidor de alfa-amilasa es capaz de inhibir amilasas de origen vegetal, se encuentra el de Warschalewski (1977a) y (1977b) en que el-



inhibidor de alfa-amilasa presente en el grano de trigo - -  
(germinado o sin germinar) inhibe las amilasas del mismo --  
grano a 6 días de germinación.

En todos los casos reportados, los niveles de ---  
inhibición de las diversas amilasas por el mismo inhibidor--  
son diferentes, la razón por la cual ésto sucede no esta --  
claramente delucidada, sin embargo, la posibilidad del estud  
dio de interacciones enzima-inhibidor pueden eventualmente--  
ser de valor al examinar la topografía de la estructura y -  
sitio activo de las alfa-amilasas.

INHIBIDORES DE ALFA-AMILASAS DE TRIGO.- Como se-  
comentó anteriormente, los inhibidores de alfa-amilasa de -  
trigo son los que más atención han recibido.

En 1943, Kneen, E. Y Sandstedt, R. M. reportaron--  
por primera vez la existencia de inhibidores de alfa-amila-  
sas en cereales, principalmente en trigo y centeno, también  
lo detectaron en algunos sorgos, pero fueron incapaces de -  
detectarlos en cebada, avena, maíz, arroz y otros sorgos. -  
La actividad inhibitoria que encontraron fue determinada --  
frente a amilasa salival. Esta sustancia fue soluble en --  
agua, en soluciones diluidas de sales y en soluciones de all  
cohol, pero resultó ser insoluble en éter de petroleo. Es-  
te factor inhibitorio era precipitado con grandes cantida--

des de sulfato de amonio y altas concentraciones de alcohol, con éter de petroleo y éter etílico, este precipitado al -- ser redissuelto en agua, resultaba ser nuevamente activo. - La sustancia era retenida por membranas de dialisis, siendo altamente termoestable en soluciones acuosas, conservando - su actividad después de ser calentada a temperaturas supe-- riores a 90°C, sin embargo, era inactivada completamente al ser tratada en autoclave por 30 minutos a 15 lb de presión- (121°C). (Kneen, E. y Sandstedt, R. M. 1943 y 1946).

Militzer, W. y colaboradores (1946a) reportaron - la preparación, purificación y propiedades del inhibidor de amilasas encontrado en trigo. La preparación fue realizada por precipitación fraccionada con etanol; de un extracto -- acuoso de harina de trigo, este precipitado fue después ad- sorbido en óxido de aluminio a pH 5.0 y después eluido a pH 7.5. Estos autores probaron la inactivación con ác. nitro- so, encontrando completa inactivación en condiciones tales que la temperatura y el pH por si sólo no tenían efecto. Al - tratar al inhibidor con fisina (una proteasa), éste fue des- truido. Estas pruebas, aunadas a 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 purifica- do, al realizarse contra agua destilada daba como resultado la completa inactivación, pero cuando ésta 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 sólo 10 min. entanto que para pH 5.3 la inactivación se realizaba sometiendo al inhibidor a una temperatura de 97 - 98°C durante 60 min.

El inhibidor fue tratado con oxidantes y reductores fuertes siendo la velocidad de destrucción por oxidantes mayor que la producida por los reductores.

En Otro reporte de Militzer, W. y colaboradores (1946b), estudiaron el modo de acción del inhibidor de amilasas encontrado en trigo y concluyeron que la efectividad del inhibidor se incrementaba al encontrarse en solución. Al estudiar su cinética, encontraron una inhibición de tipo no competitivo, así mismo, vieron que la molécula de trip-tofano es esencial para conservar la actividad del inhibidor.

En 1965, Shainkin, R. y Birk, Y. al presentarse en la XXXV Reunión de la Sociedad Química Israeli su primer informe sobre la purificación y algunas propiedades del inhibidor de amilasas presente en trigo. La purificación -

la realizaron por precipitación con sulfato de amonio, seguida de cromatografía en columna con DEAE - Celulosa y CM/celulosa, con lo que encontraron dos inhibidores diferentes a los que denominaron  $Aml_1$  y  $Aml_2$ . Ambos inhibidores fueron proteínas con pH isoelectrico de 9.0 y 9.4 respectivamente. Las autoras mostraron la homogeneidad de las proteínas por ultracentrifugación, electroferesis en geles de poli-acrilamida y en papel y por cromatografía de intercambio iónico. En cuanto al peso molecular, encontraron que éstos eran de 18 000 para  $Aml_1$  y 29 000 para  $Aml_2$ , también encontraron diferencias en la composición de aminoácidos. Las mismas autoras reportaron en 1967 la dependencia que tiene el orden de adición de los reactantes en el tipo de inhibición que observaban. El inhibidor podía combinarse tanto con la enzima como con el sustrato, ya que cuando la reacción enzimática se empezaba con la adición de sustrato a la mezcla de enzima-inhibidor, la constante de inhibición ( $K_i$ ) fue de  $3 \times 10^{-9}$  M y la inhibición fue de tipo no competitivo, en tanto que cuando la reacción de iniciaba agregando la enzima a la mezcla sustrato - inhibidor, la  $K_i$  fue de  $1 \times 10^{-7}$  M y la inhibición fue competitiva, además encontraron que para el primer caso, se requiere media molécula de inhibidor por molécula de enzima para llevar a cabo 50% de inhibición, en tanto que para el segundo caso, requirieron 500 veces más inhibidor para alcanzar la misma inhibición. Al analizar sus gráficas encontraron que el inhibidor podía combinarse con la enzima en más de un sitio, sien

do la combinación con el sitio regulatorio la responsable de la inhibición de tipo competitivo, en tanto que la unión con el sitio catalítico produzca la inhibición de tipo no competitivo. Entre otras cosas también encontraron que la interacción de la enzima con el inhibidor fue dependiente del pH, siendo la mayor afinidad de la enzima por el inhibidor a pH 7.0, que es además el óptimo para la reacción enzimática, lograron demostrar la formación de los complejos E-I; S - I y E - I - S por ultracentrifugación, cromatografía en Sephadex G - 100 en columna y en capa fina, y por electroforesis en geles de poliacrilamida y acetato de celulosa (Shainkin, R. y Birk, Y. 1967). Algunos años después, las mismas autoras resumen sus hallazgos acerca del inhibidor de alfa-amilasa de trigo adicionando un poco de información, encontraron que el inhibidor Aml<sub>1</sub> resultó ser más resistente a altas temperaturas que Aml<sub>2</sub> ambos inhibidores fueron destruidos por digestión con pepsina y pronasa, pero no fueron afectados por carboxipeptidasa o por tratamiento con HCl 0.02M. El inhibidor Aml<sub>1</sub> perdió su actividad al ser sometido a digestión con tripsina o quimotripsina, en tanto que Aml<sub>2</sub> casi no fué afectado. Ambos inhibidores fueron inactivados por reducción con mercaptoestanol, pero no perdieron su actividad al ser tratados con urea 6.4 Molar, las modificaciones químicas como esterificación y carboxilación selectiva causaron gran deterioro de la actividad inhibitoria de Aml<sub>2</sub> al tratar de inhibir las amilasas del insecto Tenebrio molitor y la amilasas salival. Los tratamientos cortos con bromuro de cianógeno produjeron una inactivación idéntica -

en la actividad inhibitoria de ambas proteínas, que además fueron inactivados por tratamiento con fluorodinitrobenzeno y con ácido nitroso, pero no fueron afectados por carbamida ción. (Shainkin, R y Birk, Y. 1970).

Saunders, R.M. y Lang. J.A. (1973) reportaron la purificación y propiedades fisicoquímicas de los inhibidores presentes en trigo. El procedimiento de purificación fue esencialmente el mismo que el reportado por Shainkin y Birk (1965, 1967 y 1970). En cuanto a las propiedades, reportaron la presencia de una tercera fracción también con características albuminoideas. Los tres inhibidores encontrados presentaron cinéticas de inhibición reversibles, lineales, no competitivas frente a alfa-amilasa pancreática de pollo.

Este trabajo, aunado al de Shainkin y Birk (1965-, 1967 y 1970) dan las primeras evidencias de que existen múltiples formas de proteínas de trigo capaces de inhibir alfa-amilasa de mamíferos.

En 1973, Silano, V. y colaboradores analizaron -- los niveles de inhibidores encontrados anteriormente por -- Shainkin, R. Y Birk Y. (1965, 1967 y 1970) y Saunders, R.M. y Lang, J.A. (1973), encontrando fuertes diferencias entre las tres formas.

En 1976, Petrucci, T. y colaboradores se dedicaron a caracterizar a una proteína de trigo denominada 0.19 por Sodini y Colaboradores (1970), estudiada como inhibidor de amilasas por Silano, V. y colaboradores en 1973. Entre las propiedades encontraron que la acción inhibitoria contra amilasa salival es dependiente del orden en que se adicionan los reactantes, previniendose cuando el inhibidor es incubado con el sustrato y siendo máxima cuando la enzima y el inhibidor son preincubados juntos, También encontraron que la adición de maltosa revertia la acción inhibitoria cuando ésta era determinada frente a alfa-amilasa salival. Dicha actividad inhibitoria resulto ser resistente a los tratamientos con tripsina y temperatura, pero fue fuertemente reducida por tratamientos con pepsina y reducción de uniones disulfuro, Cuando trataron al inhibidor con bromuro de cianógeno, la actividad contra amilasas de mamíferos se vió fuertemente afectada, mientras que la acción contra amilasas de insectos se mantuvo inalterada.

En trabajos consecutivos, Warshalewski, J.R. (1977a y 1977b) reportó el aislamiento y purificación de inhibidores de alfa-amilasa, tanto en trigo sin germinar como en el trigo malteado, de la misma variedad. En estos trabajos estableció un esquema de purificación que utilizó para los dos tipos de muestra, consistente en tratamientos con temperatura, fraccionación con acetona y cromatografía-

de intercambio iónico, fundamentalmente. Cuando la muestra utilizada fue trigo sin germinar, encontró después de la cromatografía, cinco fracciones activas contra las amilasas del propio grano a seis días de germinación. Este es el primer reporte en que un inhibidor de amilasas es capaz de inhibir las propias amilasas del grano del que se extrae, y en general, de inhibir amilasas de origen vegetal, sin embargo, el autor no es capaz de medir la inhibición de extractos crudos de trigo frente a la amilasa de trigo, en tanto que la actividad contra alfa-amilasa fúngica y bacteriana pueden ser perfectamente medible. Las cinco fracciones activas de la cromatografía presentaron diferentes especificidad frente a las diferentes amilasas, así, las cinco fueron activas frente a las amilasas del grano germinado, sólo dos lo fueron frente a alfa-amilasa bacteriana y cuatro de ellas inhibieron alfa-amilasa de Aspergillus oryzae. Sólo la primera fracción que eluyó de la columna fue capaz de inhibir las tres diferentes amilasas, inhibiendo con mayor fuerza la amilasa fúngica. Las fracciones tercera y quinta, inhibieron fuertemente las amilasas del grano, en tanto que las fracciones II y IV presentaron mayor capacidad para inhibir amilasa fúngica.

Quando los inhibidores de amilasa fueron extraídos de trigo malteado, este autor encontró que la localización de las fracciones eluidas de la misma columna de intercambio iónico, así como los porcentajes de inhibición de la amilasa nativa, se asemejan a las fraccio



nes II, III y V del trigo sin germinar. Sólo encontró estos tres picos, sugiriendo que son remanentes de los encontrados en el grano sin germinar y que los picos que faltarían fueron destruidos por proteólisis durante la germinación. Al analizar sus resultados, encontró que van de acuerdo con algunos reportes en los que se indica que la actividad proteolítica incrementa grandemente la velocidad de hidrolisis del almidón.

Granum, P.E. y Whitaker, J.R. (1977) reportaron la purificación y caracterización de inhibidores de alfa-amilasa presentes en trigo, sin aportar amoyores conocimientos que la presencia de un inhibidor con peso molecular de 30 000 D y la comparación de sus propiedades con los otros encontrados anteriormente por otros investigadores (0.19 y 0.28 de Silano y colaboradores 1973; y Aml<sub>1</sub> y Aml<sub>2</sub> de Shainkin, R. y Birk, Y. 1970). Además de haber encontrado los mismos inhibidores antes indicados, encontraron un tercer inhibidor con movilidad electroforética relativa de 0.55, con peso molecular de 30 000 D, pI 4.2, composición de aminoácidos semejantes al inhibidor 0.19, con pequeñas diferencias en el contenido de arginina e histidina. Otra diferencia de este inhibidor con 0.19 fue la incapacidad de inhibir alfa-amilasa pancreática de porcino, inhibiendo únicamente alfa-amilasa salival humana. En cuanto a las características fisicoquímicas en comparación con otros investigadores no en-

contraron grandes diferencias.

En 1977, Buonocore, V. y colaboradores, propusieron un esquema de las interacciones conocidas y las posibilidades que se desprendían de las características fisicoquímicas de los inhibidores de alfa-amilasa encontrados en trigo, estudiados hasta esa fecha, por los demás investigadores. En cuanto a la naturaleza proteica de los inhibidores encontrados, decidieron dividirlos en dos grandes grupos, los de naturaleza albuminoidea y los gliadínicos, dejando una incógnita acerca de las implicaciones relacionadas con esta naturaleza proteica.

#### INHIBIDORES DE ALFA-AMILASA DE Phaseolus vulgaris

A pesar de que los inhibidores de alfa-amilasa presentes en frijol fueron detectados desde 1945 (Bowman, D.E. 1945), no fue sino hasta 1968 cuando se empezaron a estudiar sus propiedades. Jaffé, W.G. y Vega-Lette, C.L. (1968) al estudiar la presencia de algunos factores termolábiles presentes en algunos tipos de frijoles, indicaron 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.

Hernández, A. y Jaffé, W.G. (1968) estudiaron al inhibidor de alfa-amilasa presente en frijol, "in vivo" e -

"in vitro", encontrando que las ratas alimentadas a base de frijoles excretaban una gran cantidad de almidón no digerido, además de que extractos acuosos de dichos frijoles eran capaces de inhibir la actividad de amilasa pancreática "in vitro". En este trabajo describieron algunas características fisicoquímicas y cinéticas de este inhibidor. La purificación parcial la llevaron a cabo bajando al pH de la solución y calentando. Con este procedimiento ayudan a purificar al inhibidor al mismo tiempo que eliminan la actividad amilolítica intrínseca de las preparaciones. Al analizar la dependencia del tiempo de preincubación del inhibidor con alfa-amilasa pancreática encontraron que se requerían dos horas como mínimo para obtener el 100% de inhibición. El tipo de inhibición que encontraron fue incompetitivo, frente a la misma amilasa. En otros experimentos demostraron que la actividad inhibitoria desapareció por completo al calentar el extracto durante 15 min. a 100°C, - este inhibidor fue incapaz de cruzar membranas para dialisis, y no fue retenido en columnas de Shephadex G-75, con lo que concluyeron que el inhibidor poseía un peso molecular mayor de 50 000 D y podía ser una proteína.

Jaffé, W.G. y colaboradores, (1973) estudiaron la presencia del inhibidor de amilasas en varias legumbres, encontrando que de 95 cultivos estudiados, sólo 14 no presentaron actividad inhibitoria detectable, al medirla frente a

amilasa pancreática. Los extractos más activos fueron los de Phaseolus vulgaris, en tanto que los de lentejas y dos especies de chicharos (Cicer arietinum y Vigna sinensis) mostraron los menores niveles de inhibición.

En un trabajo semejante, Marshall, J.J. (1975c), midió la actividad antiamilolítica de extractos de diferentes legumbres frente a alfa-amilasas pancreática y salival, encontrando que al igual de lo observado por Jaffé, y colaboradores en 1973, todas las variedades de Phaseolus vulgaris probadas contenían altos niveles de actividad inhibitoria, con pocas diferencias entre las variedades. La actividad inhibitoria fue nula o muy baja en las legumbres de --- otras especies, como garbanzo, lentejas, soya y algunos chicharos. En los casos de inhibición, ésta fue similar para las amilasas pancreática y salival, de tal manera que se -- pueden usar cualquiera de estas dos preparaciones amilolíticas para la detección del inhibidor, al menos para los extractos de Phaseolus vulgaris.

En un trabajo más sobre el inhibidor de amilasas presente en frijol. Marshall, J.J. y Lauda, C.M. (1975b) reportaron la purificación y algunas propiedades del inhibidor denominado "Faseolamina", presente en Phaseolus vulgaris. Este inhibidor fue purificado por los métodos convencionales para proteínas, incluyendo tratamientos con calor, diálisis y cromatografía de intercambio iónico y filtración en

gel. En cuanto a las propiedades, reportaron un pH de 5.5- como óptimo para la preincubación del inhibidor con alfa-amilasa pancreática, así como una temperatura de 37°C como la adecuada para dicha preincubación. Indicaron también -- que la adición de sustrato a la enzima antes del inhibidor- previene la inhibición. Al medir la estequiometria de la - inhbición encontraron la formación de un complejo 1:1 entre el inhibidor y alfa-amilasa pancreática. El complejo fue - disociado facilmente en pH ácido, aparentemente por destruc ción de la enzima, sin embargo, dicho complejo no pudo ser- disociado en otras condiciones que resultaron ser desfavora bles para la inhibición, como baja temperatura y alto pH. - La inhibición mostrada fue del tipo no - competitivo frente a alfa-amilasa pancreática de porcino.

En dos trabajos seguidos, Powers J. R. y Whitaker, J.R. (1977a y 1977b), purificaron y caracterizaron fisico- químicamente al inhibidor de alfa-amilasa presente en fri- jol (Phaseolus vulgaris), estudiando además el efecto de al gunos parámetros experimentales en la combinación de este - inhibidor con alfa-amilasa pancreática de porcino. Para la purificación, primeramente estudian el contenido de inhibi- dor en diferentes legumbres, encontrando qu el frijol rojo- (light red Kindney bean) contenía la mayor cantidad de --- inhbidor, en comparación con las otras especies estudiadas, razón por la cual utilizan esta semilla como fuente de ob--

tención del inhibidor. La purificación la realizaron por tratamiento con temperatura, fraccionamiento con etanol y cromatografía de intercambio iónico, obteniendo preparaciones homogéneas por electroforesis en poliacrilamida tiñiendo para proteínas y carbohidratos. En el análisis de aminoácidos encontraron que era rico en ácidos aspártico y glutámico, serina, treonina y valina, con bajo contenido de aminoácidos azufrados y sin prolina. Esta ausencia de prolina difiere grandemente con lo encontrado por Shainkin, R. Birk, Y (1970) en trigo, en que encuentran un alto contenido de dicho aminoácido, Encontraron también un contenido de 8.6% de carbohidratos en el peso del inhibidor, unidos por medio de un enlace con asparagina. El peso molecular aparente de este inhibidor fue de 49 000 D formado por 4 subunidades posiblemente diferentes. Reportan un pI de 4.65 y lograron demostrar la formación del complejo inhibidor - enzima con alfa-amilasa pancreática porcina, por filtración en gel, este complejo mostró un peso molecular equivalente a la formación del complejo 1:1 entre la enzima y el inhibidor, con esto demuestran además que la inhibición de alfa-amilasa no es debida a proteólisis de la enzima ni a la quelación del calcio necesario para la actividad amilolítica. En cuanto al efecto de diversos parámetros en la combinación del inhibidor con la enzima, encontraron que requiere de un pH de 5.0 para que la velocidad de formación del complejo sea máxima, además la formación de este comple-

jo se ve fuertemente afectada por la fuerza iónica siendo más rápida en soluciones con fuerza iónica alta. Al oxidar la porción de carbohidrato de la molécula de inhibidor observaron que la actividad inhibitoria se perdía completamente, con lo que indicaron que posiblemente la parte de carbohidrato sea importante para la actividad antiamilolítica, debido a la afinidad de las amilasas por los carbohidratos. Para localizar el sitio de unión de la enzima con el inhibidor, trataron a la enzima con tripsina para obtener una porción capaz de unirse a Sahphadex (un pseudosustrato) y por lo tanto representaría el sitio activo, encontrando que el inhibidor no reconoce a esta molécula modificada, en tanto que el Sephadex se sigue uniendo en forma normal. Por otro lado, al tratar al complejo enzima - inhibidor con maltosa (inhibidor competitivo de alfa-amilasa), ésta es capaz de unirse tanto a la enzima sola como al complejo, lo que les da una idea de que la enzima se une al inhibidor por un sitio diferente al sitio activo.

#### EFFECTOS FISIOLÓGICOS Y SIGNIFICANCIA NUTRICIONAL DE LOS INHIBIDORES DE ALFA-AMILASA.

La presencia de altos niveles de inhibidores de alfa-amilasa en alimentos vegetales comunes, particularmente legumbres y cereales, suscita la pregunta de que si es

tos inhibidores pueden tener algún efecto sobre la alfa-amilasa "in vivo" y, si así es, si esto puede resultar en impedir la digestión de almidón.

En 1964 Applebaum, J.W. estudió el efecto "in vivo" del inhibidor de amilasa encontrado en trigo, analizando la digestión del almidón por la larva del insecto Tenebrio molitor L. que ataca normalmente al trigo y sus productos. Basándose en su acción sobre amilopectina, glicogeno y dextrina beta-límite, se dice que las amilasas de este insecto son de tipo alfa. En su estudio, Applebaum utilizó tres dietas básicas para medir el desarrollo del insecto, - la primera dieta tomada como control, contenía almidón de arroz, glutén, levadura seca y colesterol. La segunda contenía además, al inhibidor de alfa-amilasa de trigo y la tercera tenía los componentes básicos y un extracto de trigo conteniendo las amilasas propias del grano y al inhibidor. La segunda dieta, que contenía al inhibidor purificado provocó la mortalidad de los insectos, además, los que sobrevivían tenían un peso que equivalía a la mitad del que presentaron las larvas control. Por otro lado, resultaron ser siete veces más pequeñas que las larvas sometidas a la tercera dieta. El desarrollo incompleto de las larvas alimentadas con la segunda dieta no pudo atribuirse a un impedimento, ya que todos los factores presentes en esta dieta también lo estaban en la tercera dieta. Las larvas fue-



ron capaces de utilizar sus propios componentes enzimáticos en la digestión amilolítica de las dietas artificiales al estar libres de la actividad inhibitoria (primera dieta). - El gran incremento en el desarrollo de las larvas en presencia de las amilasas del grano pudo deberse a que la digestión del almidón por las larvas solas no es muy eficiente.

Applebaum, S.W. y Konijn, A.M. (1965), estudiaron la utilización del amidón por la larva de otro insecto que también ataca al trigo: Tribolium castaneum,. Nuevamente caracterizan a las amilasas del insecto como del tipo alfa por sus propiedades frente a varios activadores e inhibidores de la actividad amiloítica y encontraron que el crecimiento del insecto es mucho menor en dietas conteniendo al inhibidor de amilasa encontrado en trigo que en las dietas control, además al hacer el estudio "in vitro" observaron que soluciones muy diluídas del inhibidor (0.25%) son capaces de inhibir fuertemente la actividad amilolítica inicial de la larva (hasta 93%).

Strumeyer, D.H. (1972) involucró al inhibidor de amilasas encontrado en trigo y centeno como la causa de una enfermedad denominada "celiac", que se caracteriza por el metabolismo incompleto de almidón y la absorción de grasa. - Este autor purifica al inhibidor de centeno y trigo, comparándolos primeramente en sus características fisicoquímicas. Encontró que ambos son del tipo de proteínas gliadi--

nicas, que es uno de los principales componentes del glutén además comprueba que preparaciones comerciales de gliadina de trigo tienen el mismo efecto inhibitorio sobre amilasas sa lival y pancreática, por lo que consideró que este inhibi-- dor puede estar involucrado en la , enteropatía inducida -- por el glutén de trigo y centeno, o sea, los síndromes de - malabsorción intestinal característicos de la enfermedad ce liac, muy común en grupos pediátricos.

Contrariamente a lo expresado por Knenn, E. y - - Sandstedt, R. M. en 1946, y Shainkin, R. y Birk, Y. en --- 1970 acerca de la poca o nula significancia que pudieran te ner los inhibidores de amilasas presentes en trigo en la fi siología humana debido a su susceptibilidad a proteólisis, - Marshall, J.J. (1975c) muestra evidencias de que los inhibi<sup>u</sup> dores proteicos de amilasas pueden jugar un papel importan- te en modular la digestión de almidón "in vivo" como lo de- muestra en un trabajo con ratas alimentadas con dietas arti<sup>u</sup> ficiales adicionadas del inhibidor aislado de trigo, en for<sup>u</sup> ma activa o inactivado por autoclave, en que observó un in- cremento en el crecimiento de las ratas alimentadas con el inhibidor inactivo.

Estas evidencias aunadas a las encontradas por -- Lang, J.A. y colaboradores (1974) que en su trabajo con el- título "Interferencia del metabolismo de almidón por inhibi<sup>u</sup>

dores de alfa-amilasa" estudiaron el efecto "in vivo" de -- los inhibidores de amilasa encontrados en trigo, al alimentar a ratas con dietas conteniendo almidón o inhibidor activo o inactivado y utilizando como control dietas con sacarosa como fuente de carbohidratos, nos hacen concluir que la actividad biológica del inhibidor es una interferencia específica en el metabolismo del almidón y no debido a una toxina general, ya que los animales alimentados con el inhibi--dor activo presentaban poco crecimiento y presencia de almidón sin digerir en las heces, en tanto que cuando el inhibi--dor fue inactivado, el crecimiento fue normal y similar al--de los animales alimentados con las dietas control.

En cuanto a los inhibidores de amilasas encontrados en frijol, tenemos que Jaffé, W. G. y Vega - Lette, C. L. (1968)- estudiando la presencia de algunos factores termolabiles -- presentes en algunos tipos de frijol capaces de inhibir el -- crecimiento de ratas, observaron que al alimentar ratas -- con frijoles conteniendo al inhibidor de amilasas se mostraban algunos desordenes, como la presencia de almidón en las heces de estos animales. Las ratas alimentadas con glucosa en lugar de almidón, no presentaron este problema. El papel del inhibidor de amilasas como factor importante podía explicar el efecto antinutricional que estos autores encontraron en sus experimentos.

Hernández, A. y Jaffé, W. G. (1968), basandose en los resultados anteriores, publicaron un trabajo con experimentación "in vivo" con ratas alimentadas con frijoles ricos en inhibidor de amilasas. Estos autores dan una implicación nutricional a la presencia de este tipo de sustancias en las leguminosas que se ha encontrado poseen bajo valor nutritivo cuando se consumen crudas, proponiendo estudios acerca de los efectos que pudieran tener al ingerir al inhibidor purificado. También especulan sobre el posible papel regulador del inhibidor sobre las amilasas de la propia semilla.

Jaffé, W.G. y colaboradores (1973) discuten acerca de la implicación nutricional que pudiera tener la presencia del inhibidor de amilasas en las semillas que son consumidas crudas, tanto por animales como por humanos, dando a estas sustancias un importante papel como causantes del pobre valor nutricional de estos alimentos.

Al analizar el hecho de que el inhibidor es incapaz de afectar la actividad amilolítica de la propia semilla, excluyen la función reguladora que pudieran tener estos factores en el metabolismo de las plantas de las cuales se derivan.

Siguiendo con el estudio de los inhibidores de --

amilasas de frijoles, Jaffé, W.G. y Flores, M.E. (1975) reportaron el efecto de la acción en diferentes condiciones, sobre la toxicidad de los frijoles y el valor nutritivo de éstos. El estudio fue realizado "in vivo" e "in vitro". En la primera parte, utilizaron ratas a las que alimentaron con harina de frijoles sometidos a diferentes tratamientos de cocción, colocando como controles la alimentación con casina como control positivo y la alimentación con frijoles crudos como control negativo. Sus resultados mostraron que todos los frijoles estudiados, cuando se consumían crudos, mostraron baja digestibilidad, después de cocción en autoclave, la digestibilidad aumento, la prueba de hemaglutinación resultó debilmente positiva en algunos frijoles y fuerte en otros, la actividad antiproteolítica desapareció, en tanto que la actividad antiamilolítica sólo disminuyó, sin desaparecer. Al analizar sus resultados, no pudieron encontrar correlación entre las actividades antiproteolíticas y antiamilolítica de los frijoles tratados con su valor nutricional, por lo que concluyeron que la actividad de los inhibidores enzimáticos no es índice útil para determinar la eficiencia de los tratamientos térmicos de los frijoles para mejorar el valor nutricional.

En un trabajo sobre el efecto de un inhibidor de alfa-amilasa aislado de frijol, en el crecimiento de ratas Savaiano, D.A. y colaboradores (1977) alimentaron a animales

de experimentación con dietas libres de almidón y conteniendo almidón suplementadas con inhibidor de alfa-amilasa libre de acción antitriptica y hemglutinante. Sus resultados mostraron que la presencia del inhibidor no afectó el crecimiento de las ratas cuando es adicionado a dietas libres de almidón, demostrando que el inhibidor no es toxico "per se" por otro lado, tampoco encuentran efecto del inhibidor en dietas con almidón, con lo que demuestran que el inhibidor no afecta la disponibilidad de energía en esta dieta. En este trabajo, los autores eliminan la posibilidad de que el inhibidor de amilas de frijol pudiera interferir en la digestión del almidón, en ratas en crecimiento, y al analizar los resultados de otros autores indicaron que estos se deben a que no controlaron la cantidad de almidón que administraron a los animales, además de no permitir que los animales satisfagan sus requerimientos energéticos.

Basandose en los resultados obtenidos al alimentar a animales de experimentación y observar a pacientes humanos que han ingerido alimentos con elevada actividad antiamilolítica, Buonocore, V. y colaboradores (1977) en una revisión, concluyeron que en vista de la posible acción "in vivo" de estas sustancias, cuando se requiere el máximo valor nutricional, la presencia de inhibidores de amilasas en los alimentos debe ser considerada indeseable y debe tenerse especial atención en destruirlo durante los procesos de preparación. En particular la oportunidad de prevenir la

presencia de inhibidores de amilasas activos en la dieta de infantes y pacientes con problemas para hidrolizar proteínas, debe ser tomada en cuenta.

Schmidt, D. y Plus, W. (1971) basándose en la capacidad del inhibidor de trigo para inhibir las amilasas -- pancreáticas y salival, humanas, presentaron una patente en que indican el procedimiento de purificación del inhibidor para ser usado en productos farmacéuticos como agente antihiperglucémico, Este inhibidor es usado entonces como retardante o inhibidor de la digestión de almidón o glucógeno.

Con la misma idea de aplicaciones terapéuticas, - Marshall, J.J. (1975c) sugirió el posible uso de los inhibidores de amilasas como un nuevo agente dietético, para usarse en la terapia de obesidad en sujetos que tengan dificultad para eliminar completamente los almidones de su dieta. Otra aplicación podría encontrarse en la administración del inhibidor a individuos diabéticos para que puedan consumir moderadas cantidades de almidón.

Recientemente, Yeter, M.A. y colaboradores (1979) presentaron un trabajo en que dan a los inhibidores de amilasas de trigo una significancia como posibles factores de resistencia del trigo a la infestación post-cosecha. Este -- trabajo lo abordaron midiendo la capacidad de inhibición de

las amilasas de varios insectos por diferentes extractos de trigo, así como observando a la progenie resultante de hacer crecer a estos insectos en los mismos trigos. Estudiaron 50 muestras de trigos y dos insectos. Después de analizar sus resultados concluyeron que los niveles de inhibición de las amilasas pueden ser una media válida de la resistencia del trigo a la infestación post-cosecha producida por insectos.

Por último, Warchalewski, J.R. (1977a y 1977b), - discutió acerca de la presencia de inhibidores de amilasas en los granos de trigo sin germinar o malteados, y les da una importante función fisiológica, consistente en controlar la actividad alfa-amilolítica de las enzimas intercelulares. Este autor sugiere que existen tres factores fundamentales que intervienen en la activación de las alfa-amilasas endógenas de los cereales: a) la actividad del agua en los granos; b) el incremento de acidez en las semillas; y c) la acción de las proteasas activas, siendo este último factor el responsable de eliminar los inhibidores de amilasas unidos en las enzimas preformadas. Este autor sugiere un mecanismo de activación de las amilasas presentes en el grano, de la siguiente manera: las enzimas (alfa-amilasa y proteasas) están unidas a sus inhibidores, lo que puede demostrarse sólo cuando los complejos son disociados, y debido a cambios físico-químicos como cambio de pH, se pueden disociar, la --



translocación interna de los componentes puede ser facilitada por un incremento del contenido de agua durante la fase de imbibición y los inhibidores de alfa-amilasa pueden ser parcialmente digeridos por las proteasas liberadas y/o difundidos hacia las capas externas de la semilla, en donde son absorbidos en la celulosa de la cubierta de la semilla como ha sido sugerido para los inhibidores de tripsina que se encuentran en el centeno. Finalmente, este autor analizó el efecto del ácido giberélico en algunas enzimas y proteínas para apoyar su hipótesis, indicando que cuando las semillas son colocadas con ácido giberélico se observa un decremento del pH, al mismo tiempo de incrementos en las actividades de alfa-amilasas y proteasas. Con estos resultados y sus observaciones indica la necesidad de reevaluación de los estudios de síntesis "de novo" de alfa-amilasas durante el proceso de malteado, sin embargo, el presente estado en el conocimiento concerniente a las isoenzimas de alfa-amilasa y sus inhibidores nativos en cereales no puede excluir completamente la síntesis "de novo" de alfa-amilasa durante la germinación, al menos para parte de las isoenzimas encontradas en el trigo malteado.



CENTRO DE INFORMACION  
DE  
POSGRADO

## MATERIALES Y METODOS

## MATERIALES

Maíz híbrido H-28. Híbrido tolerante a sequías, --  
obtenido del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómi-  
cas (INIA) de Chapingo.

Semillas de Trigo, Centeno, Cebada, Triticale y --  
Sorgo. Del Colegio de Postgraduados de Chapingo.

Insectos adultos. Tribolium castaneum (Host.); -  
Sitophilus zeamais (L); y Rhizopertha dominica (L.) Obteni-  
dos del INIA.

Alfa-amilasa de Bacillus subtilis. ICN Pharmaceu-  
tical Inc. Cat. 100447. Lot. 0897. Parcialmente purificada.

Alfa-amilasa de Aspergillus oryzae. Sigma. Cat. --  
A-6630, Lot. 65C-0220. Tipo IV-A Cruda.

Alfa-amilasa pancreática de porcino. Fluka A.G. --  
Cat. 10080, Lot. 163912-85. pancreatina.

Beta-amilasa de cebada. Sigma. Cat. A-7130, Lot. --  
93C-8070 Tipo IIB.

Citocromo C. Sigma. Cat. C-2506, Lot. 67-7240. Tipo III. Lysozima. Sigma. Cat. L-6876, Lot. 74C-8040. Grado I 3X, Inhibidor de tripsina. Sigma. Cat. T-9128, Lot. 34C-8180 Tipo II-S.

Ribonucleasa. Calbiochem. Cat. 55674, Lot. 701342-Grado A, 5X.

Celulasa. Sigma. Cat. C7377, Lot. 78C-8440. Tipo I Pepsina. Worthinton Biochemical Corp. Cat. PM71A. 2X.

Tripsina. ICN Pharmaceuticals Inc. Cat. 103140, -- Lot. 4663 12X.

Albumina bovina sérica. Calbiochem. Cat. 12657, -- Lor. 53-055 Grado A Electroforeticamente pura.

Pronasa. Sigma. Cat. P5130, Lot. 58C-8080. Tipo VI Hide Power Azure, Sustrato para proteasas. Calbiochem. Cat. 37716, Lot. 570026. Grado B.

Glucógeno (+) puriss. Fluka A.G. Cat. A54268.

Sephadex G-75 y G-150 y Azul de Dextran 2000. de Pharmacia Chemical Co.

Acrilamida y Bisacrilamida de Merk. Fuerón recristalizadas. La acrilamida se recristalizó en cloroformo -- (70 g/l) y la bisacrilamida en acetona (40 g/l).

Todas las otras sustancias fueron grado reactivo - y se usó agua desionizada.

## METODOS.

### PURIFICACION DEL INHIBIDOR DE AMILASAS.

Las semillas de maíz fueron molidas hasta obtener harina, empleando un molino Superline-S tipo SC-ES 200W 4P-Mitsubisini Electric Co. Japan.

La harina fue extraida por agitación magnética con NaCl 0.1M en una relación 1:5 p/v por 2 hs a 4° C. El líquido decantado y filtrado a través de 8 capas de gasa fue centrifugado a 3 000 g durante 60 min. a 4° C. El precipitado fue descartado y el sobrenadante líquido con pH 7.0 fue -- dializado contra agua desionizada durante 24 hs a 4° C.

La solución fue centrifugada a 5000 g durante -- 60 min a 4° C. y el precipitado inactivo fue desechado. El sobrenadante fue llevado a 60% de saturación con sulfato de amonio sólido y mantenido a 4° C con agitación magnética, -

después de 24 hs, la mezcla fue centrifugada 60 min a 11 000 g. El precipitado activo fue resuspendido en la mínima cantidad de agua desionizada, dializado a 4°C, contra agua desionizada y centrifugado a 25 000 g durante 60 min.- El sobrenadante activo fue liofilizado.

El material liofilizado se disolvió en NaCl 0.05 M y se dializó toda la noche contra la misma solución. El producto obtenido fue aplicado a una columna de Sephadex G-75 (1.9 x 50 cm) previamente equilibrada con la misma solución. La elusión se realizó con la misma solución colectando fracciones de 5 ml. El flujo de la columna fue de 20 ml/hr.

Las fracciones de la cromatografía con actividad inhibitoria, fueron colectadas y dializadas contra agua desionizada. La solución dializada fue liofilizada y redisolta en la mínima cantidad de NaCl 0.05 M y aplicada a una columna de Sephadex G-150 (1.9 x 50 cm) previamente equilibrada con la misma solución. Las fracciones activas fueron juntadas, dializadas contra agua desionizada y liofilizadas.

#### ACTIVIDAD INHIBITORIA

La actividad del inhibidor de alfa-amilasa de maíz H-28 se determinó midiendo la disminución de la actividad -

amilolítica, la cual se determinó por los métodos de yodo - (Hopkins, R.H. y Bird, R. 1954) y cobre (Nelson, N. 1944).- El sustrato empleado fue almidón para determinar diastasa - al 0.15% ó almidón soluble (0.05 a 2%) en buffer succinatos 0.02M,  $\text{CaCl}_2$  0.01M y NaCl 0.1M PH=5.0!

Metodo de yodo (Hopkins, R.H. y Bird, R. 1954).

Una mezcla de solución enzimática (0.1 ml), solución de inhibidor (0 a 0.1 ml) y solución de extracción, -- (llevadas a un volúmen total de 0.2 ml) fue preincubada por 20 min a 25° C. La reacción se inició al agregar 1.0ml de solución de sustrato. Después del tiempo de reacción deseado (usualmente 8-10 min) la reacción fue parada por la adición de 5.0 ml del reactivo de yodo (1.0 ml de solución de yodo 0.04M en 250 ml de HCl 0.1N). Se leyó la absorbancia a 620 nm contra un blanco preparado de la misma manera sin almidón. Se preparó un control sin enzima para obtener el valor del almidón integro.

Las unidades de actividad se definieron como la diferencia en la absorción del almidón digerido y el no digerido por unidad de tiempo:

$$U_{\text{act}} = \frac{\text{Abs} - \text{Abs}'}{t}$$

en donde Abs representa la absorbancia del almidón íntegro, Abs' la absorbancia del almidón digerido y t es el tiempo de reacción.

Método de cobre (Nelson, N. 1944)

Una mezcla de enzima (0.5 ml), solución de inhibidor (0.0 a 0.5 ml) y solución de extracción (completando un volumen total de 1.0 ml) se incubaron por 20 min a 25°C. La solución de sustrato (1.0 ml de almidón soluble a pH 5.0) se adicionó para iniciar la reacción. Después del tiempo de reacción deseado (5, 10 y 20 min) se tomó una alicuota de 0.2 ml que se adicionaron a 0.2 ml del reactivo D (1.0 ml) de  $\text{CuSO}_4$  0.6M en 25 ml de tartrato doble de sodio y potasio 0.1 M, carbonato de sodio 0.23 M, bicarbonato de sodio 0.23 M y sulfato de sodio 1.4 M) para detener la reacción. La mezcla se calentó 20 min en baño de agua hirviendo e inmediatamente se enfriaron en agua corriente. Se adicionaron 0.2 ml del reactivo C (molibdato de amonio 0.4 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.8 M y arsenato de sodio 0.02M), agitando vigorosamente para eliminar el  $\text{CO}_2$ . Se dejó reaccionar por 10 min, se agregaron 5.0 ml de agua desionizada y se midió la absorbancia a 520 nm contra un blanco preparado de la misma manera pero sin enzima. Se preparó una curva standard usando maltosa (50 a 500 ug/ml).

Las unidades de actividad se definieron como la cantidad de maltosa liberada por unidad de tiempo, por mg de -

proteína.

Las unidades de inhibición se definieron para ambos casos, como la cantidad de unidades de actividad inhibidas por gramo de maíz o por mg de inhibidor.

#### DETERMINACION DE PROTEINAS.

La concentración de proteínas de las preparaciones fue determinada usando el método de Bearden, J.C.Jr. (1978) con azul de Coomasie G-250 (0.1% en ácido fosfórico 17%) -- usando Citocromo c y Albúmina bovina sérica como estanda---res.

La solución de proteínas por estudiar se mezcla con un volúmen igual del reactivo colorante y se transfiere a -- una cubeta del espectrofotómetro (se recomienda utilizar -- cubetas de vidrio o plástico, debido a la tendencia del complejo proteína-colorante de unirse al cuarzo). Se lee la -- absorción del complejo a 595 nm.

#### CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS

Se utilizó el método de fenol-aç sulfúrico (Dubois, - M. y colaboradores 1956) con la siguiente adaptación; 0.5 ml de la solución del inhibidor purificado se mezclaron con --



0.3 ml de una solución de fenol acuoso al 5%, se adicionaron 1.8 ml de ác. sulfúrico concentrado, se mezcló vigorosamente y se dejó enfriar a temperatura ambiente, leyéndose la absorbancia a 480 ó 490 nm contra un blanco preparado -- sustituyendo la muestra por agua.

Se usaron como estandares glucosa, xilosa, almidón para diastasa, ác. ribonucleíco, peroxidasa, hexoquinosa y pepsina .

#### DETERMINACION DE PESO MOLECULAR.

El peso molecular del inhibidor de amilasas de -- maíz H-28 fue determinado por cromatografía en filtración - en geles, en una columna de Sephadex G-75 (1.9 X 50 cm) elu yendo con NaCl 0.05M.

La columna fue estandarizada con albúmina sérica - bovina, celulasa, pepsina, tripsina, inhibidor de tripsina, lisozima y ribonucleasa. El volúmen muerto fue determinado con azul de dextran 2000.

El peso molecular se confirmó con dos métodos elec troforéticos (Weber, K. y Osborn, M. 1969 a pH 7.6 y Davis, B.J. 1964 a pH 8.8). Los cuales consisten en la prepara--- ción de geles de disco con poliacrilamida al 10%, contien

do S.D.S al 0.1% a los diferentes pHs. La muestra aplicada en los geles se trata con SDS al 0.2% en presencia de beta-mercaptoetanol al 2%.

#### ELECTROFORESIS EN GELES.

Se llevó a cabo la determinación electroforética del inhibidor usando geles de poliacrilamida al 10% corridos a pH 8.8 sin SDS usando azul de bromofenol como marcador. Las muestras contenían de 50 a 100 ug de proteína y se corrieron a temperatura ambiente. Los geles fueron sacados de los tubos y teñidos con azul de coomasie R-250 0.05% con TCA al 50%.

Genels paralelos sin teñir se cortaron en secciones de 3 mm y se aluyeron con el buffer de actividad durante 24 hs a 4°C. midiendo después la actividad inhibidora.

Se corrió una electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida al 10% a pH 8.8 sin SDS en un aparato ISCO--Colora Ultraphor Mod. 1650 colectando 200 fracciones de 3.0 ml cada una (12 veces el volumen de gel), determinando la actividad inhibitoria de cada fracción.

## ACTIVIDAD PROTEOLITICA.

Se determinó actividad proteolítica del inhibidor, por el método de Rinderknecht, H, y colaboradores, (1968) -- usando Hide Powder Azure como sustrato, que al hidrolizarse libera un compuesto colorido. Para ello, 10 mg de sustrato se suspenden en 1.2 ml de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.8 conteniendo la muestra y se incuban a 30° C o 37° C.

La reacción se detiene colocando los tubos en hielo y agregando 2.0 ml de metanol al 10%. El producto se -- filtra y el filtrado se lee a 595 nm contra un blanco preparado sin muestra.

## DIGESTION CON PROTEASAS.

La digestión con proteasas se llevó a cabo por -- dos métodos.

Digestión con pronasa. (Hotta, Y. y Bassel, A. -- 1965) que consta de la disolución de la muestra en buffer -- Tris 0.4M pH 8.5, adicionando la décima parte de EDTA salino (EDTA 0.1M con 0.15M de NaCl a pH 8.5) y la quinta parte de una solución CSC (buffer citrato 0.15M con NaCl 1.5M -- a pH 7.0) y un volumen igual a la muestra de solución de -- pronasa (4 mg/ ml) incubando por 18 hs a 37° C, después de

de los cuales se aumenta la temperatura a  $53^{\circ}$  C durante --  
4 hs para que la pronasa se autodigiera.

Al mismo tiempo se coloca un control en las mismas condiciones, pero usando solución de extracción en lugar de solución de pronasa.

Digestión con pepsina, (Saunders, R. M. y Lang, --  
J.A. 1973). 100 microlitros del inhibidor disuelto en agua--  
se preincuban con 1.1 mg de pepsina en HCl 0.02M en un vo--  
lúmen de 0.3 ml durante 15 min. Se coloca un control sin -  
pepsina. La solución se neutraliza con 0.3 ml de bicarbonaa  
to de sodio 0.1 M y se lleva a cabo el método normal para -  
medición de actividad inhibitoria.

## RESULTADOS

A pesar de que en estudios previos se indicaba la ausencia de inhibidores de amilasa en granos de maíz (Kneen, E. y Sandstedt, R.M. 1946) en el presente trabajo fue posible demostrar la presencia de dicho inhibidor en semillas - del maíz H-28, lo cual reportamos previamente en un trabajo de tesis (Iturbe-CH, F.A. 1976). De ahí que se decidiera - seguir el estudio de este factor inhibitorio encontrado en diferentes variedades de maíz, enfocando el estudio al maíz H-28.

A fin de estudiar la localización de este inhibidor en la semilla de maíz se procedió a disectarla, separando el embrión y el escutelo del endospermo y la capa de aleurona, y a su vez, la capa de aleurona del endospermo. Al determinar la actividad inhibitoria en cada una de las fracciones obtenidas, se encontró que toda la actividad inhibitoria se localizaba asociada a la fracción del endospermo - de la semilla, lo que resultó ser semejante a lo encontrado por Buonocore, J. y colaboradores. (1977) para los inhibidores de amilasa presentes en trigo.

Con este antecedente y considerando que el 80% de la semilla del maíz H-28 esta constituida por el endospermo, se procedió a estudiar las condiciones en las cuales se pu-

diera purificar el inhibidor de amilasas a partir de harina obtenida del grano completo.

#### PURIFICACION

Una preparación fresca de harina del maíz H-28 se extrajo con solución 0.1 M de cloruro de sodio en una relación 1.5 p/v debido a que se encontró que con esta solución se extraía mayor actividad inhibitoria (Tabla 2), por otro lado, haciendo una analogía con los inhibidores encontrados en trigo, centeno y frijol, éstos son proteínas del tipo albuminoideo o gliadínico, las cuales son muy solubles en soluciones salinas diluidas, por lo que se podría esperar que en el caso del maíz también lo fueran.

El extracto obtenido de la centrifugación de la suspensión de cloruro de sodio fue dializado, tratado con sulfato de amonio hasta obtener una saturación del 60% con el objeto de precipitar la actividad inhibitoria. Como puede observarse en la Tabla 3 y la Figura 1, la actividad inhibitoria se precipita completamente a una saturación de 60% con sulfato de amonio. Inicialmente se intentó realizar una precipitación fraccionada del inhibidor del maíz H-28, llevando la saturación hasta 20% y después de 20 a 60%, pero se presentaban una serie de problemas en esta metodología. En la solución de 20-60% de saturación con sul-

TABLA No. 2.- Solubilidad del inhibidor de amilasas presente en el maíz H-28.

Solvente	Actividad Inhibitoria (a) extraída. (Uinh/g maíz)
Agua desionizada	3.91 $\pm$ 0.15
Solución de NaCl 0.01 M	3.84 $\pm$ 0.30
Solución de NaCl 0.10 M	4.61 $\pm$ 0.13
Solución de NaCl 0.20 M con CaCl <sub>2</sub> 0.02 M	4.52 $\pm$ 0.18
Solución de NaCl 0.50 M	4.32 $\pm$ 0.20

(a)

Promedios de 9 determinaciones.

TABLA No. 3.- Precipitación del inhibidor de amilasas presente en el maíz H-28 con Sulfato de Amonio.

% Sulfato de Amonio	Actividad Inhibitoria(Uinh/g maíz) <sup>a</sup>	
	Sobrenadante	Precipitado
0	4.62 $\pm$ 0.35	0
20	4.95 $\pm$ 0.22	0
40	1.29 $\pm$ 0.32	3.65 $\pm$ 0.23
60	0	5.13 $\pm$ 0.43
80	0	4.85 $\pm$ 0.29
100	0	4.97 $\pm$ 0.23

<sup>a</sup> Resultado de 6 determinaciones.



Fig.1.- Precipitación con sulfato de --  
amonio.

Extractos acuosos de harina del maíz H-28 (1 g/10 ml) fueron tratados con sulfato de amonio sólido a 4°C durante 24 hs, después se centrifugarón a 11 000g-60 min y se determinó actividad inhibitoria frente a amilasa de Tribolium --- castaneum en el sobrenadante dializado y el precipitado resuspendido en agua.

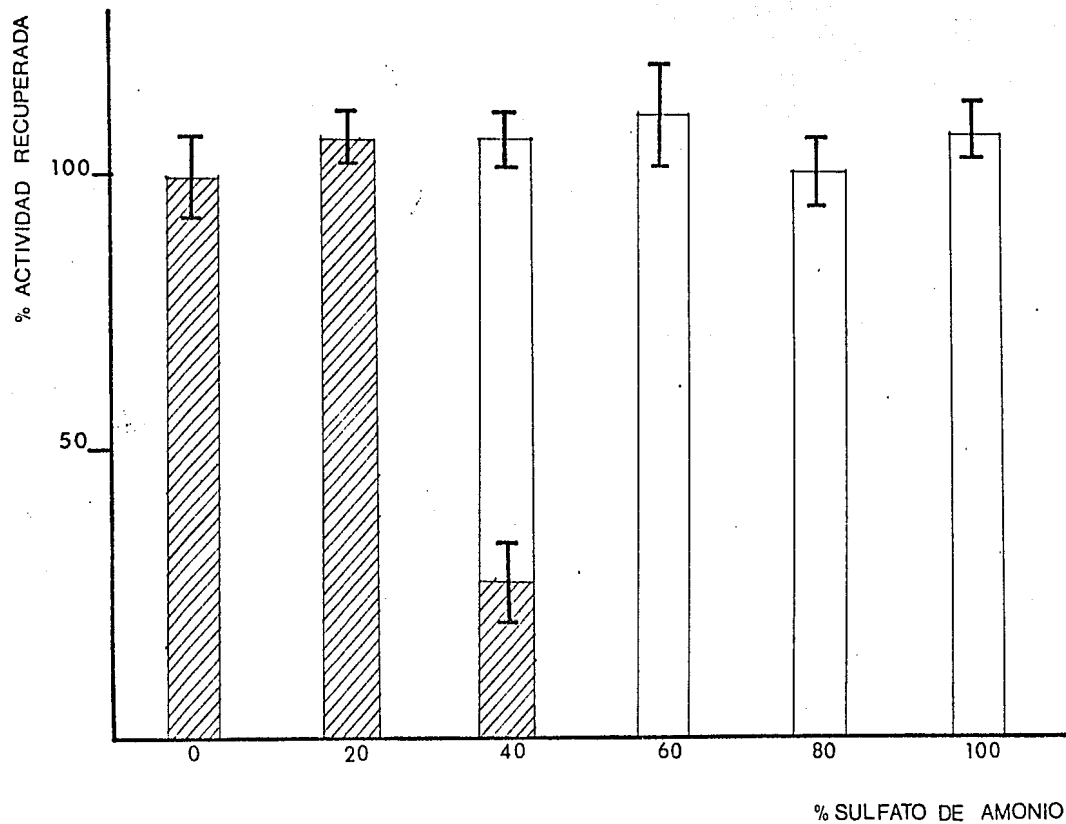


Sobrenadante



Precipitado

FIG.1.—PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO



fato de amonio se encontraba actividad inhibitoria, al igual que en el precipitado obtenido en esa misma concentración, la suma de las actividades de precipitado y sobrenadante, no resultaba en la actividad de la solución de 0-20% sino que era cerca del 10%. En tanto que al precipitar directamente a 60% de saturación, se mantenía en el precipitado cerca del 100% de la actividad.

Al aplicar el precipitado obtenido con sulfato de amonio de 0-60% de saturación en una columna de Sephadex G-75 se obtienen 3 picos de proteínas, el inhibidor en el pico homogéneo intermedio, con el máximo en la región de peso molecular 30 000 D (Fig. 2 y 3).

La cromatografía del inhibidor en Sephadex G-150 sólo elimina un contaminante pequeño en poca cantidad (Fig. 4).

En la Fig. 5 se muestra un esquema de la purificación del inhibidor de amilasas presente en el maíz H-28.

La Tabla 4 resume los resultados de la purificación, mostrando la respectiva recuperación de la actividad, así como los incrementos en actividad específica obtenidos después de cada procedimiento realizado.

Fig. 2.- Cromatografía en Sephadex G-75. El producto precipitado con 60% de sulfato de amonio fue redisolto y dializado contra agua desionizada y después liofilizado. El producto (20.96 mg de proteínas) fue redisolto en NaCl 0.05M y --- aplicado a una columna de Sephadex G-75- ( 1.9 x 50 cm ) equilibrada con la misma solución, colectando fracciones de 5 ml. ( Flujo 20 ml/h ) La actividad inhibitoria se determino frente a amilasa de --- Tribolium castaneum.

( • ) Absorción a 280 nm

( • ) Actividad Inhibitoria.

FIG. 2.— CROMATOGRAFIA EN SELPHADEx G-75

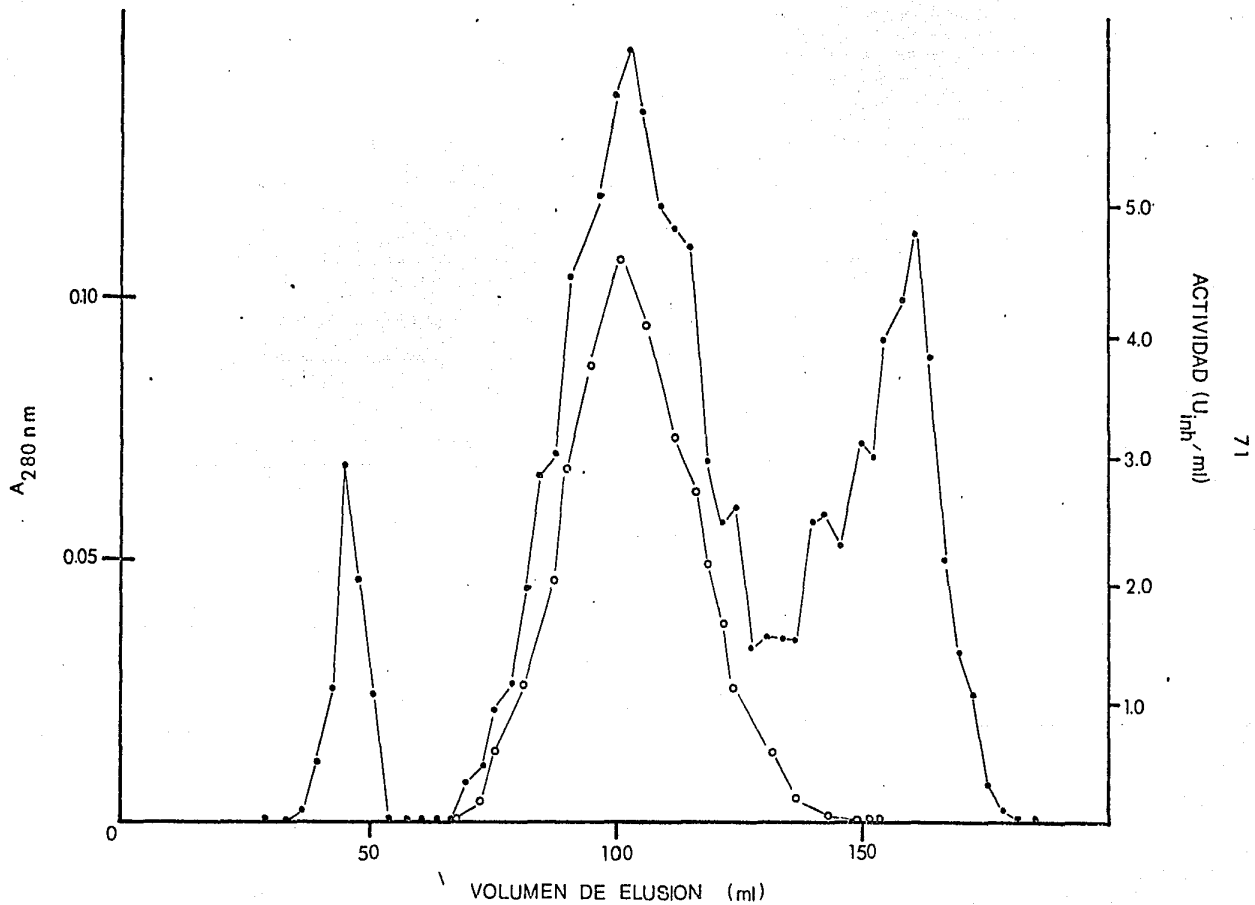


Fig. 3.- Peso molecular en Sephadex G-75. Preparaciones del inhibidor de maíz H-28 se aplicaron a una columna de Sephadex - G-75 ( 1.9 x 50 cm ) equilibrada con --- NaCl 0.05 M.

- a) Celulasa
- b) Pepsina
- c) Tripsina
- d) Inhibidor de tripsina
- e) Ribonucleasa
- f) Lisozima

FIG. 3.—PESO MOLECULAR EN SEPHADEX G-75

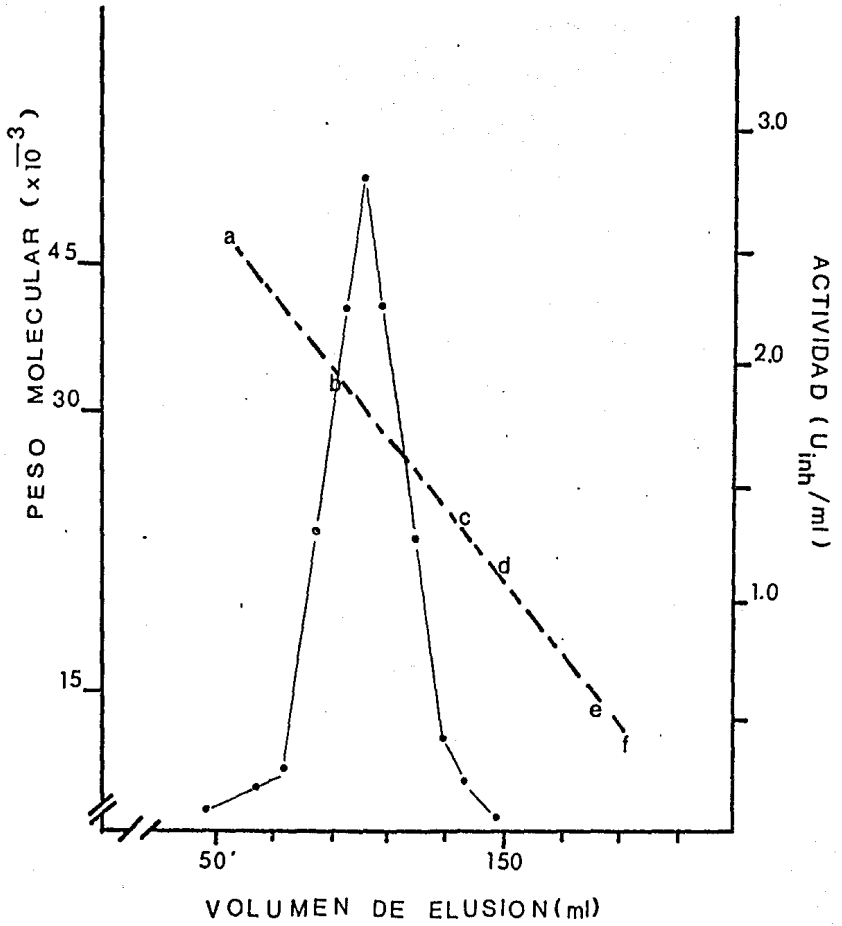


Fig. 4.-Cromatografía en Sephadex G-150. Las fracciones activas de la cromatografía en Sephadex G-75 se dializaron contra agua desionizada y se liofilizaron. El producto (8.50 mg de proteínas) fue redisolto en NaCl 0.05M y aplicado a una columna de Sephadex G-150 (1.9 x 50-cm) equilibrada con la misma solución. Se colectaron fracciones de 5 ml. (flujo 15 ml/h) la actividad inhibitoria se determino frente a amilasa de Tribolium castaneum.

( • ) Absorción a 280 nm

( ■ ) Actividad Inhibitoria.



FIG. 4. CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-150

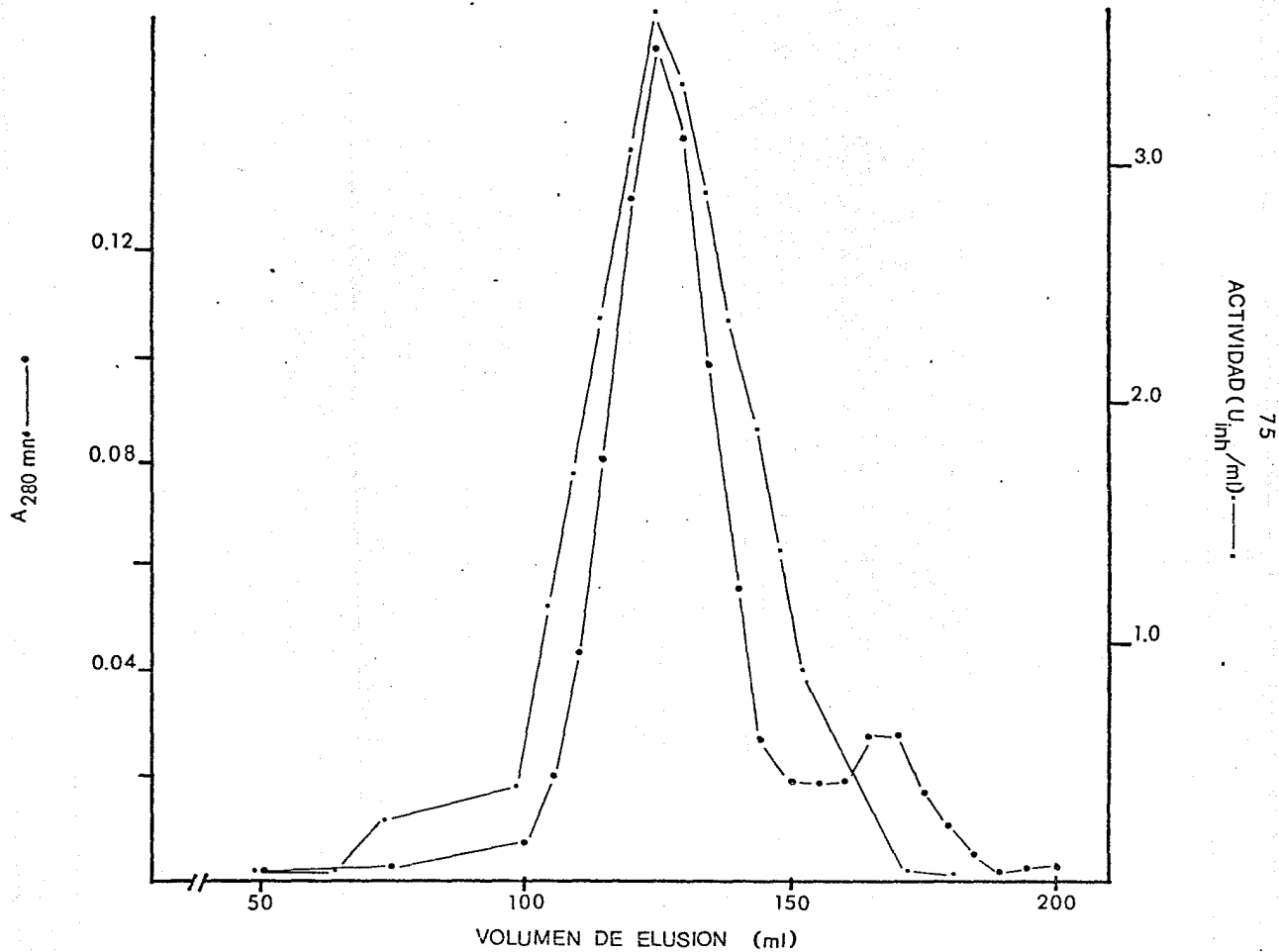
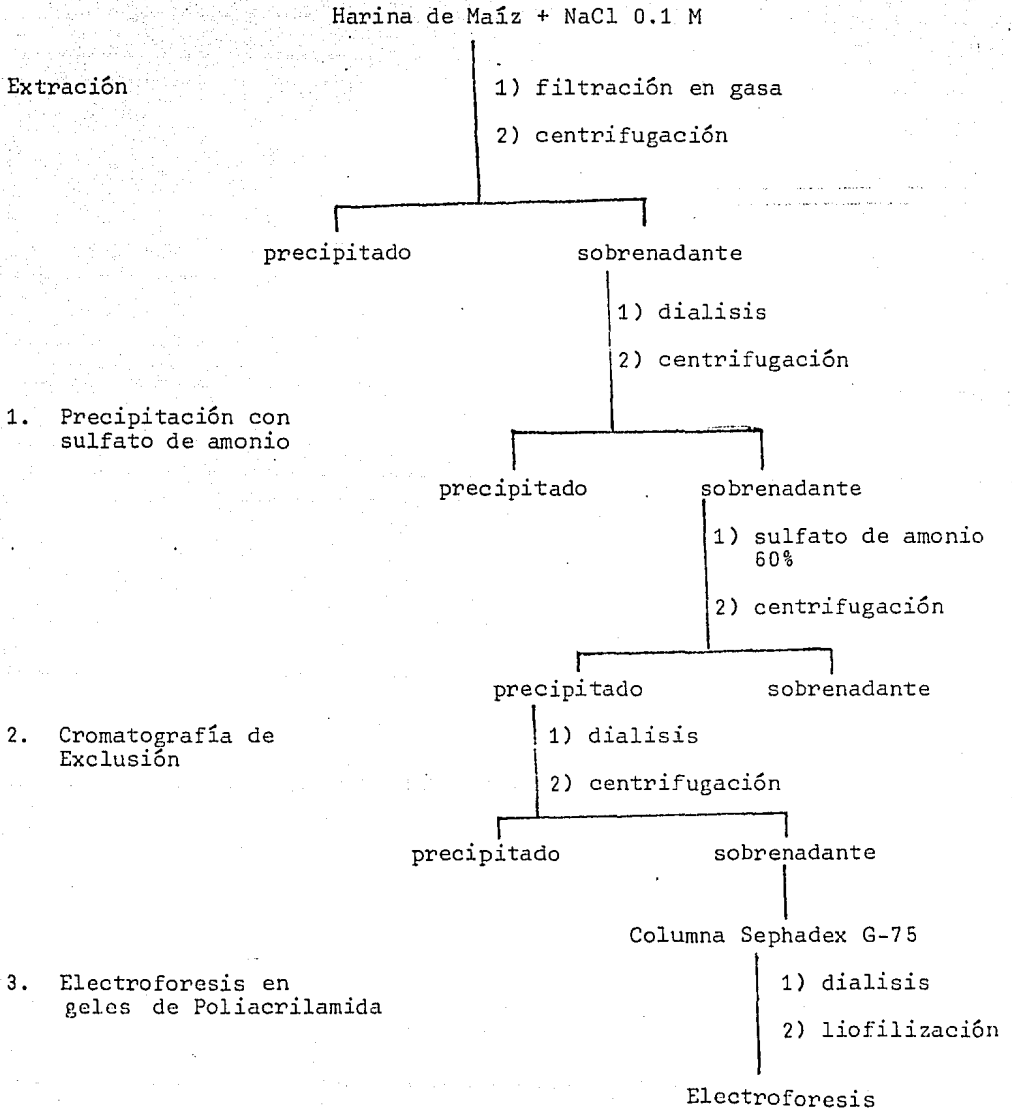


FIG. 5.- PURIFICACION DEL INHIBIDOR DE AMILASAS PRESENTE EN LA MAIZ H-28



Por diálisis de la muestra, se obtiene un incremento de 1.8 veces en la actividad específica. La precipitación con sulfato de amonio aumenta la actividad específica en 7.71 veces más. Una segunda diálisis del precipitado activo incrementa la actividad específica en 9.37 veces. La cromatografía sucesiva en Sephadex G-75 y G-150 da como resultado un incremento en la actividad específica de 18 veces más, obteniendo finalmente una purificación de 36.9 veces la actividad específica original.

El inhibidor así purificado presenta las siguientes características:

#### NATURALEZA PROTEICA.

La naturaleza protéica del inhibidor se determinó realizando pruebas generales de proteínas, como precipitación con ácido tricloroacético y sulfato de amonio, siendo ambas pruebas positivas para el caso.

El inhibidor no fue dializable aún después de 48-hrs. usando agua desionizada como solución de diálisis, a  $4^{\circ}\text{C}$ , por otro lado la actividad inhibitoria resultó ser estable a este tratamiento.

Por calentamiento mostró ser sensible a la tempe-

TABLA N°. 4.- PURIFICACION DEL INHIBIDOR DE AMILASAS

PASO	VOLUMEN (ml)	PROTEINA (mg)	U <sub>inh</sub> TOTALES	ACT. ESP. U <sub>inh</sub> /mg	RECUP. (%)	PURIF.
1.- Extracción	200	956.2	470.4	0.492		
2.- Diálisis	200	255.2	229.0	0.896	48.7	1.82
3.- (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 60%	10	48.3	226.3	4.697	48.1	9.53
4.- Diálisis	10	20.9	194.9	9.299	41.4	18.90
5.- Sephadex G-75	57	8.5	133.1	15.850	28.3	32.20
6.- Sephadex G-150	55	5.8	106.2	18.17	22.6	36.90

natura de ebullición del agua (92°C durante 15 min.).

Finalmente, el inhibidor de amilasas fue digerido por enzimas proteolíticas, perdiendo el 46% de su actividad cuando fue tratado con pronasa y el 55% al ser digerido con pepsina.

#### CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS

Ya que las amilasas son enzimas que utilizan carbohidratos como sustratos se podría esperar que una molécula que las inhibiera tuviera esa naturaleza.

Al tratar de determinar el contenido de carbohidratos del inhibidor de amilasas encontrado en maíz, por el método de Dubois, M y colaboradores (1956), usando fenol-ác. sulfúrico, no se logró detectar ningún componente de tipo carbohidrato.

#### PESO MOLECULAR.

Como se indicó anteriormente, las fracciones activas eluidas de la columna de Sephadex G-75 presentan su máximo en la región que corresponde a las proteínas de peso molecular 30 000 D (Fig. 3). Este peso molecular fue confirmado por dos métodos electroforéticos, encontrando que

cuando la electroforesis se realiza en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y mercaptoetanol a pH 7.6 - (Weber, K, y Osborn, M. 1969), el peso molecular observado es de 28 860 D, y cuando la electroforesis se lleva a cabo a pH 8.8 en poliacrilamida al 10% con SDS y mecraptoetanol - (Davis, D. 1964), el peso molecular es de 29 510 D (Fig. 6).

En ambos casos la electroforesis es llevada a cabo en sistemas conreniendo dodecil sulfato de sodio (SDS) y beta-mercaptoetanol, que disocian los complejos proteínicos dando origen a cadenas polipeptídicas sencillas.

De los datos anteriores se puede decir que el peso molecular de la fracción inhibitoria de amilasas del maíz H-28 es de 29 456 D.

#### ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA

Anteriormente se indicó que al someter al inhibidor purificado a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y mercaptoetanol, se obtienen sólo una banda que se tiñe con azul de coomasie, con un peso molecular de aproximadamente 30 000 D.

Cuando la misma preparación de inhibidor purificado es aplicada a un gel de poliacrilamida al 10% en ausen--

Fig. 6.- Peso molecular por electroforesis en poliacrilamida con SDS.

Preparaciones del inhibidor purificado - se tratarón con beta-mercaptoetanol (2%) y SDS (0.2%) y se aplicaron a geles de poliacrilamida en disco y placa (10%) -- conteniendo SDS (0.1%) utilizando 2 sistemas diferentes.

( • ) Weber, K. y Osborn, M. (1969) a pH 7.6

( ◦ ) Davis, B.J. (1964) a pH 8.8

a) Albúmina Serica Bovina

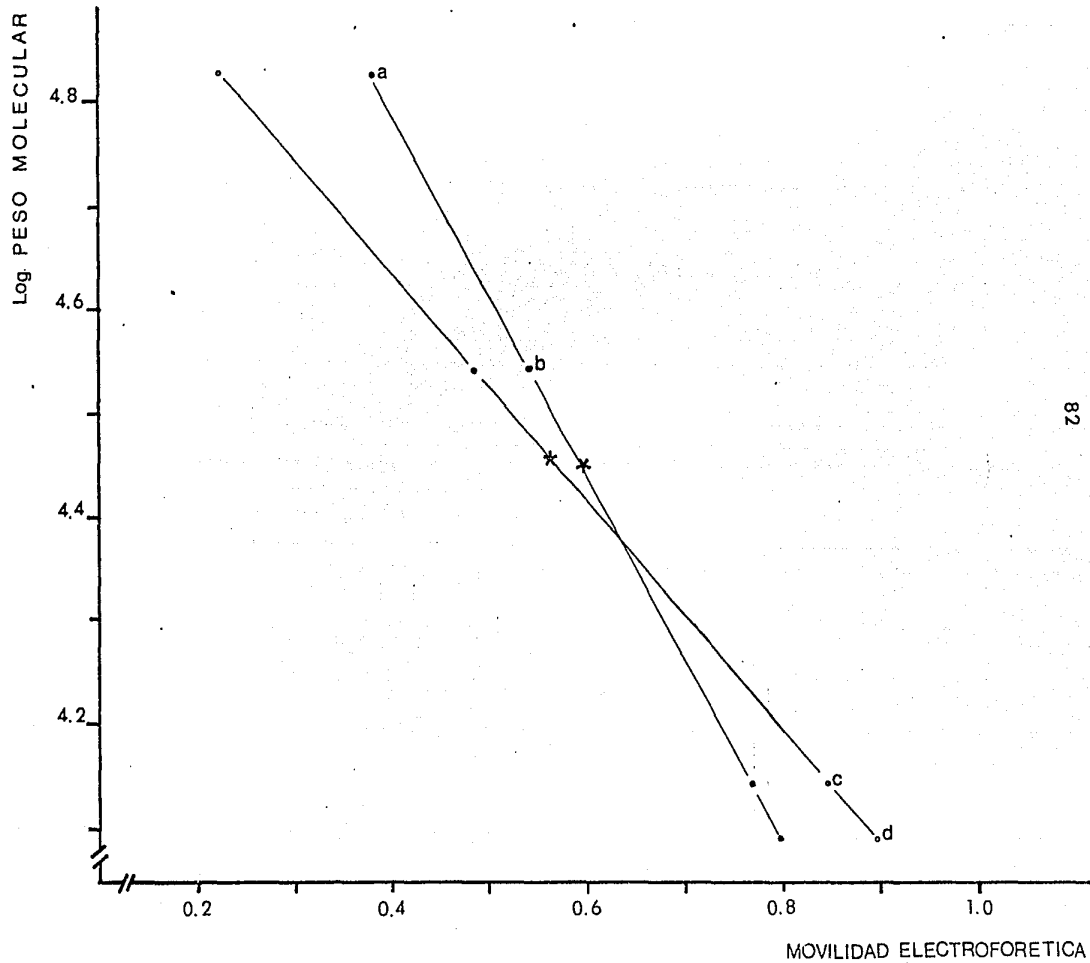
b) Pepsina

c) Lisozima

d) Citocromo C.

\* Inhibidor de amilasas de maíz H-28

FIG. 6.—PESO MOLECULAR POR ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA CON SDS





cia de sustancias desnaturalizantes (SDS o mercaptoetanol), se obtienen tres bandas proteicas, bien definidas, que al ser eluidas de geles paralelos, presentan actividad inhibitoria de alfa-amilasa (Fig. 7), no encontrándose bandas proteicas inactivas.

Se llevó a cabo una electroforesis preparativa del inhibidor purificado por las columnas de Sephadex encontrando, después de eluir 12 veces el volumen del gel, sólo dos componentes activos (Fig. 8). Al aplicar estos dos componentes en una placa de poliacrilamida al 10% para realizar una electroforesis analítica, se encontró que el componente que eluyo primero (Componente 1) mostró sólo una banda que se tiñó con azul de coomasie, en tanto que el segundo componente mostró dos bandas, una de las cuales correspondió a la banda mostrada por el componente 1. Estos resultados aunados a los encontrados en la electroforesis con SDS y mercaptoetanol parecen indicar la posibilidad de formación de agregados, lo que estaría de acuerdo a lo encontrado para el inhibidor de amilasas de trigo (Buonocore, J. y colaboradores. 1977).

#### EFFECTO DE LA TEMPERATURA

Este inhibidor de alfa-amilasa presente en maíz es estable al calentamiento, ya que puede ser calentado a -

Fig. 7.- Electroforesis en poliacrilamida y elu--  
sión de la actividad.

El inhibidor purificado (100 ug de proteína) se -  
aplicó a geles de poliacrilamida en disco (10%) se  
gún Davis, B.J. (1964) a pH 8.8 Después de la co-  
rrida, los geles se separaron en dos lotes, uno --  
fue teñido para proteínas con azul de Comasie (ilus-  
tración inferior) y el resto fueron rebanados en --  
secciones de 3 mm de los que se eluyeron las proteí-  
nas con 0.5 ml de Buffer succinatos 0.01 M con - -  
CaCl<sub>2</sub> 0.01 M y NaCl 0.1 M y después de 24 hrs se de-  
termino la actividad inhibitoria frente a amilasa -  
de Tribilium castaneum (Gráfica superior).

FIG.7.— ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA Y ELUSION DE LA ACTIVIDAD

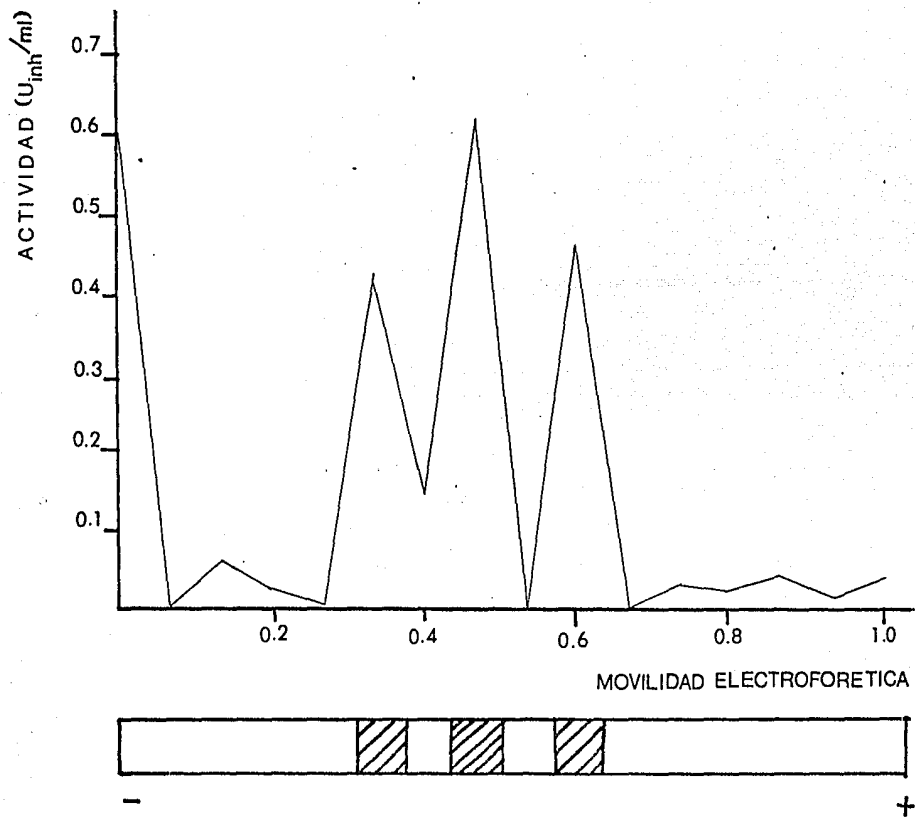
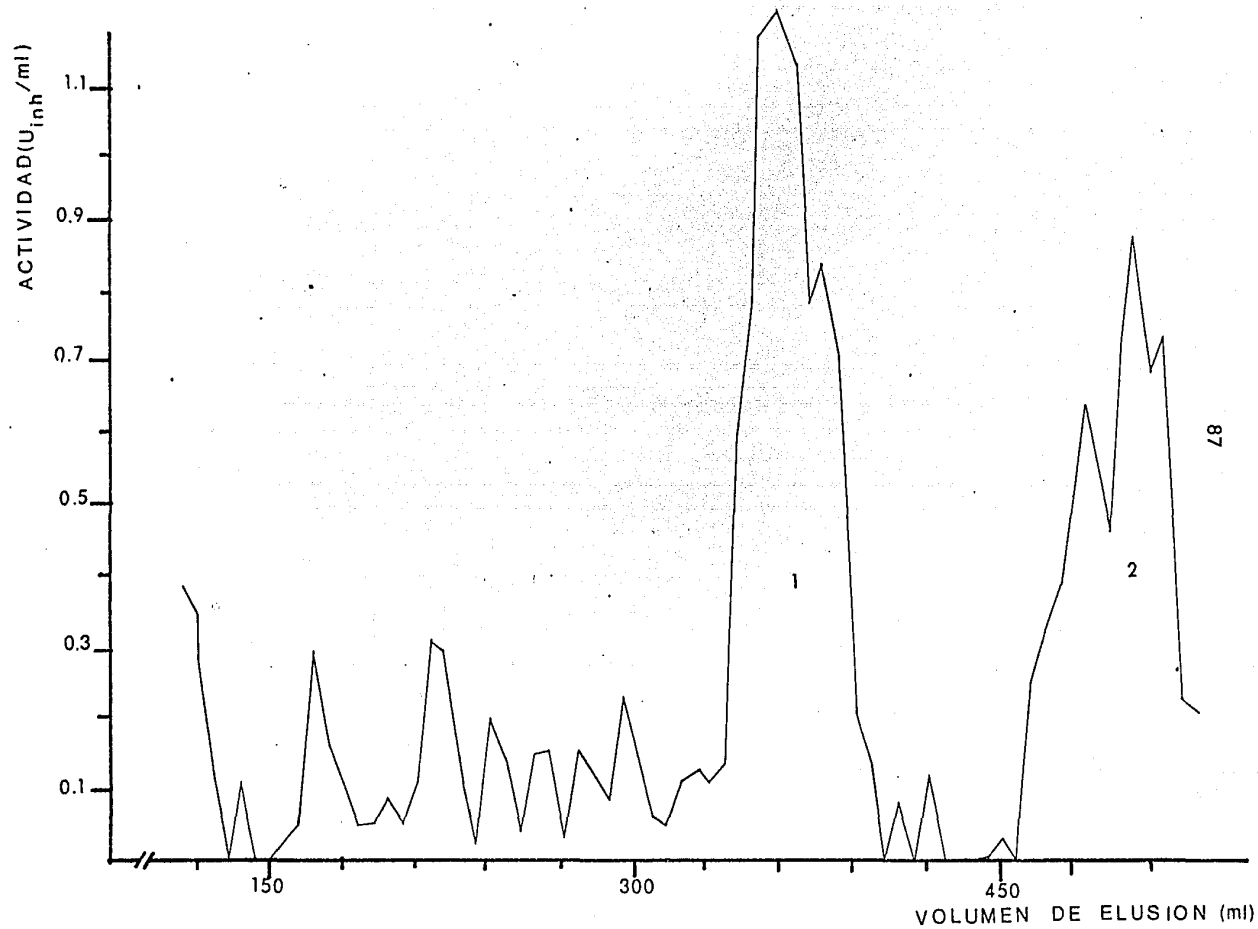


Fig. 8.- Electroforesis preparativa en poliacrilamida.

El inhibidor purificado de la columna de Sephadex G-150 (5.85 mg de proteína) se aplicaron a una --placa de poliacrilamida al 10% (15 x 9 x 0.7 cm)- a pH 8.8 según Davis, B.J. (1964) en un aparato - de electroforesis preparativa ISCO-Colora Ultra--phor Mod. 1650 colectando fracciones de 3 ml. Se colectaron 12 veces el volúmen del gel. La actividad inhibitoria se determino frente a amilasa - de Tribolium castaneum.

FIG. 8.— ELECROFORESIS PREPARATIVA EN POLIACRILAMIDA



92°C durante 5 min y mantiene toda su actividad, (Tabla 5 - y Fig. 9). Sin embargo, cuando es calentado por 15 min a - 92°C, pierde el 85% de su actividad.

Es importante notar que cuando el inhibidor es ca-  
lentado a 70°C o temperaturas superiores hasta 96°C durante  
5 min, se observa un incremento en la actividad inhibito---  
ria. (Fig. 9). Este hecho había sido previamente descrito  
por Warchalewski, J.R. (1977 a) para el inhibidor encontra-  
do en trigo y en el trabajo de tesis antecedente del presen-  
te (Iturbe-CH, F.A. 1976).

#### REQUIRIMIENTOS DE PREINCUBACION.

En un experimento en que los tiempos de equili---  
brio entre la enzima y el inhibidor fueron de 1 a 30 min, -  
la inhibición de la amilasa de Tribolium castaneum varió de  
60 a 100%, permaneciendo constante en 100% después de 10 -  
min (Tabla 6 y Fig. 10).

También se encontró que la inhibición es depen---  
diente del orden de adición de los reactivos. Cuando la so-  
lución enzimática es adicionada a una mezcla de inhibidor -  
sustrato, la inhibición es sólo el 33.8% de la obtenida -  
cuando el sustrato es el que se adiciona a la mezcla enzima  
-inhibidor.

TABLA No. 5.- Efecto del pretratamiento térmico del inhibidor de alfa-amilasa aislado del maíz H-28 sobre su actividad.

Temperatura °C	Tiempo min	$U_{inh}/g$ maíz	% act. inh. respecto a 25°C
4	5	4.83 ± 0.21 <sup>a</sup>	105 ± 4.6
25	5	4.60 ± 0.19	100 ± 4.1
50	5	5.17 ± 0.82	112 ± 17.8
70	5	8.75 ± 0.63	190 ± 13.7
92	5	7.92 ± 0.71	172 ± 15.4
92	15	0.74 ± 0.08	16 ± 1.7

a

Cada promedio es el resultado de 6 experimentos.

Fig. 9.- Efecto de la temperatura.

Extractos acuosos de harina del maíz H-28 (1g/10 ml) fueron tratados a diferentes temperaturas durante 5 min. después de los cuales se enfriaron en hielo y centrifugaron a 3 000 g durante 30 min. a --4°C y se determino su actividad inhibitoria frente a amilasa de Tribolium castaneum.



FIG. 9.— EFECTO DE LA TEMPERATURA

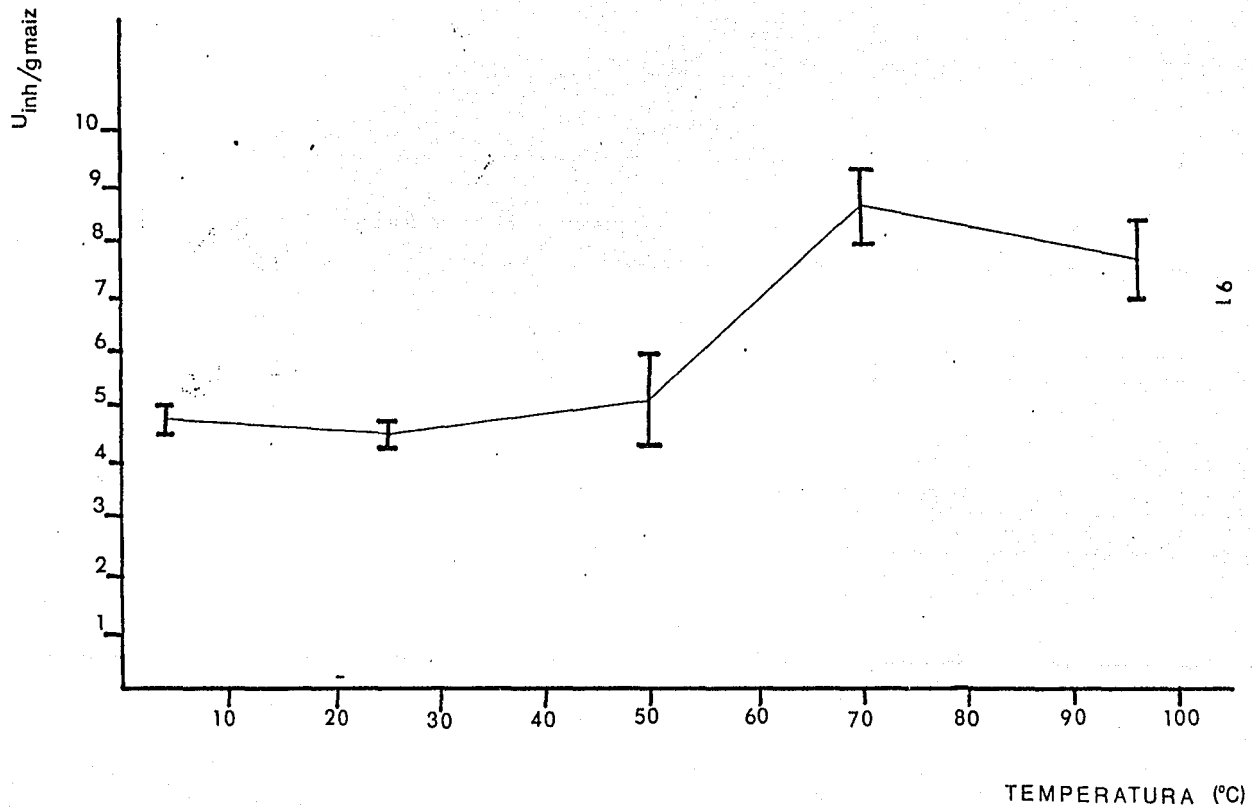


TABLA No. 6.- Efecto de la preincubación de alfa-amilasa -  
de Tribolium castaneum con el inhibidor de -  
amilasas presente en el maíz H-28.

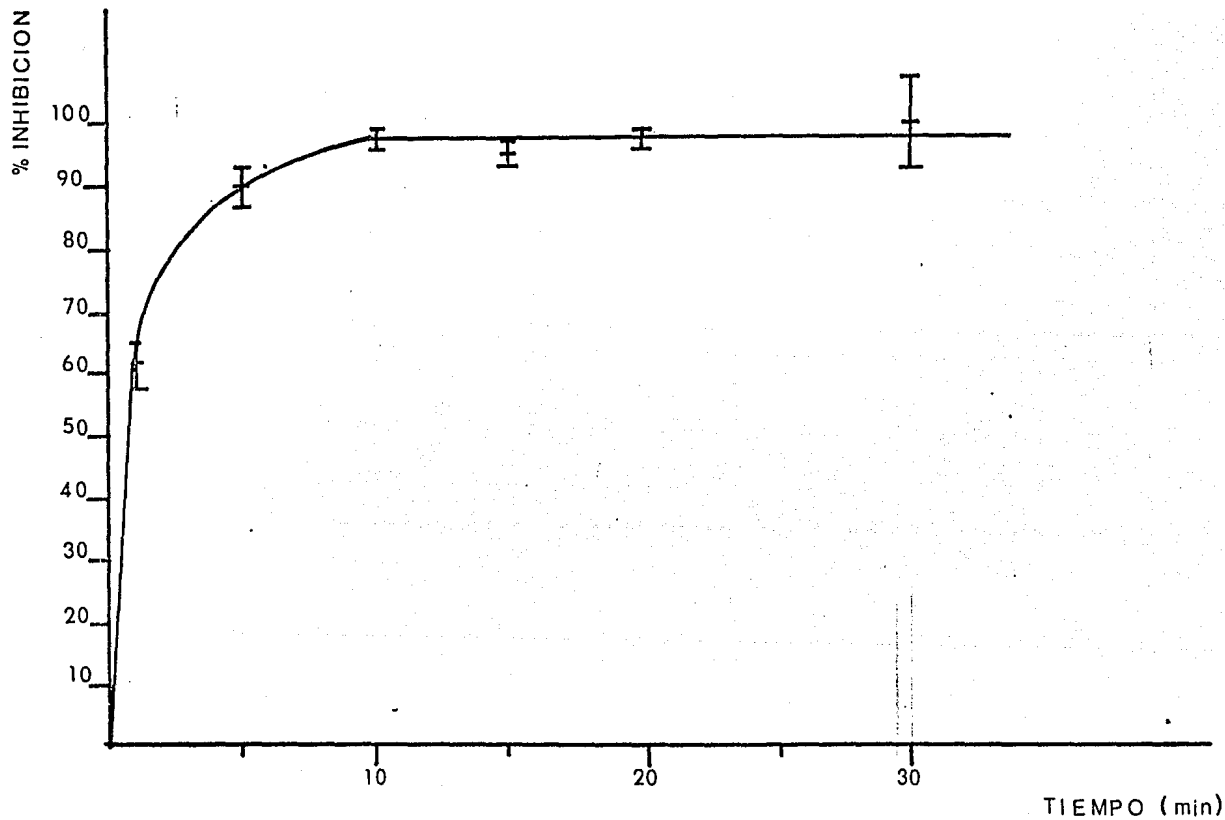
Tiempo de preincubación	% de inhibición <sup>a</sup>
1 min	63.08 ± 3.93
5 min	91.58 ± 3.13
10 min	100.80 ± 1.88
15 min	97.66 ± 1.58
20 min	100.55 ± 1.64
30 min	102.80 ± 8.50

<sup>a</sup> Cada promedio representa 6 experimentos.

Fig. 10.- Preincubación del inhibidor del maíz -- H-28 con amilasa de insecto.

Preparaciones puras del inhibidor de maíz H-28 -- (1.5 ug) obtenidos de la cromatografía en Sephadex G-150 se pusieron en contacto con preparaciones de amilasa de Tribolium castaneum por diferentes tiempos a 25°C. Para empezar la reacción se adiciono el sustrato.

FIG.10.— PREINCUBACION DEL INHIBIDOR DEL MAIZ H28 CON AMILASA DE INSECTO



Estos resultados indican que la enzima y el inhibidor requieren tiempo para "reconocerse" a fin de que se lleve a cabo la completa inhibición de la enzima. En el caso de la preincubación del inhibidor con el sustrato, probablemente se forma una unión del sustrato con el inhibidor, lo cual protegería a la enzima de la inhibición. Shainkin, R. y Birk, Y. (1970), encontraron una situación semejante para el inhibidor de alfa-amilasa reportado en trigo, el cual es capaz de unirse al almidón formando un complejo estable.

#### ACTIVIDAD PROTEOLITICA

Para eliminar la posibilidad de que el inhibidor fuese en realidad una enzima proteolítica que causara inhibición inespecífica de la amilasa, se decidió medir actividad proteolítica por el método de Rinderknecht, H. y colaboradores (1968). Este consiste en una reacción interfase, entre un sustrato proteico sintético insoluble, al que esta unido un colorante. Al realizarse la proteólisis el colorante es liberado con las pequeñas cadenas de oligopeptidos, quedando ahora en solución y pudiendo determinarse espectrofotométricamente a 595 nm. La cantidad de color liberado es directamente proporcional a la actividad proteolítica presente.

Después de 30 min a 37°C y a pH (s) 7.8 ó 5.5 no se logró detectar actividad proteolítica del inhibidor de -

amilasas del maíz H-28.

#### TIPO DE INHIBICION

Para determinar el tipo de inhibición, se llevaron a cabo experimentos con la enzima de Tribolium castaneum purificada por el método de Loyter, A. y Scharamm, M. (1962).

La actividad amilolítica se determinó por el método de Nelson, M. (1944), utilizando almidón soluble como sustrato a pH 5.0.

La gráfica de Lineweaver-Burk de los resultados obtenidos con dos concentraciones de inhibidor, muestran una inhibición de tipo incompetitivo, caracterizada por la obtención de líneas paralelas, al graficar los recíprocos de la velocidad de reacción en función del recíproco de la concentración de sustrato. Al graficar los interceptos como función de la concentración de inhibidor se observa que son lineales.

El valor de  $K_i$  se determinó utilizando las siguientes ecuaciones:

$$v = v' \left( 1 + \frac{I_0}{K_i} \right) \quad \text{y} \quad K = K' \left( 1 + \frac{I_0}{K_i} \right)$$

en que los valores  $V'$  y  $K'$  se refieren a la velocidad máxima y constante de Michaelis ( $K_m$ ) en presencia del inhibidor respectivamente,  $K_i$  es la constante de afinidad por el inhibidor e  $I_0$  es la concentración del inhibidor.

Otra forma de calcular el valor de  $K_i$  es utilizando la regráfica de los interceptos como función de la concentración de inhibidor, en donde la absisa al origen, nos da el valor de  $-K_i$ .

El valor de  $K_i$  encontrado fue de  $7.117 \times 10^{-9}$  M. - Este valor da idea de una alta afinidad del inhibidor hacia la enzima estudiada. Es importante el hecho de que  $K_i$  sea pequeña si se piensa en un posible papel fisiológico del inhibidor, ya que el inhibidor está presente en muy baja concentración en la semilla.

La Fig. 11, 12 y 13 muestran las gráficas obtenidas para determinar el tipo de inhibición del inhibidor de alfa-amilasa presente en el maíz H-28 frente a la amilasa del insecto Tribolium castaneum.

#### ESPECIFICIDAD DEL INHIBIDOR

Quizás la más importante característica del inhibidor de alfa-amilasa del maíz H-28 sea su especificidad.

Fig. 11.- Efecto del inhibidor de maíz sobre la actividad de amilasa de Tribolium castaneum. Preparaciones de amilasa de Tribolium castaneum se colocaron con soluciones de inhibidor cuya concentración no produce 100% de inhibición, se preincubaron 15 min a 25°C y se adicionó 1 ml de solución de almidón soluble a diferentes concentraciones. Se determinó la actividad enzimática por el método de Nelson, N. (1944).

- (•) Sin inhibidor
- (▪)  $5.067 \times 10^{-9}$  M de inhibidor (25% de inhibición)
- (\*)  $2.53 \times 10^{-8}$  M de inhibidor (50% de inhibición)



FIG.11.- EFECTO DEL INHIBIDOR DE MAIZ SOBRE LA ACTIVIDAD DE AMILASA DE *Tribolium castaneum*

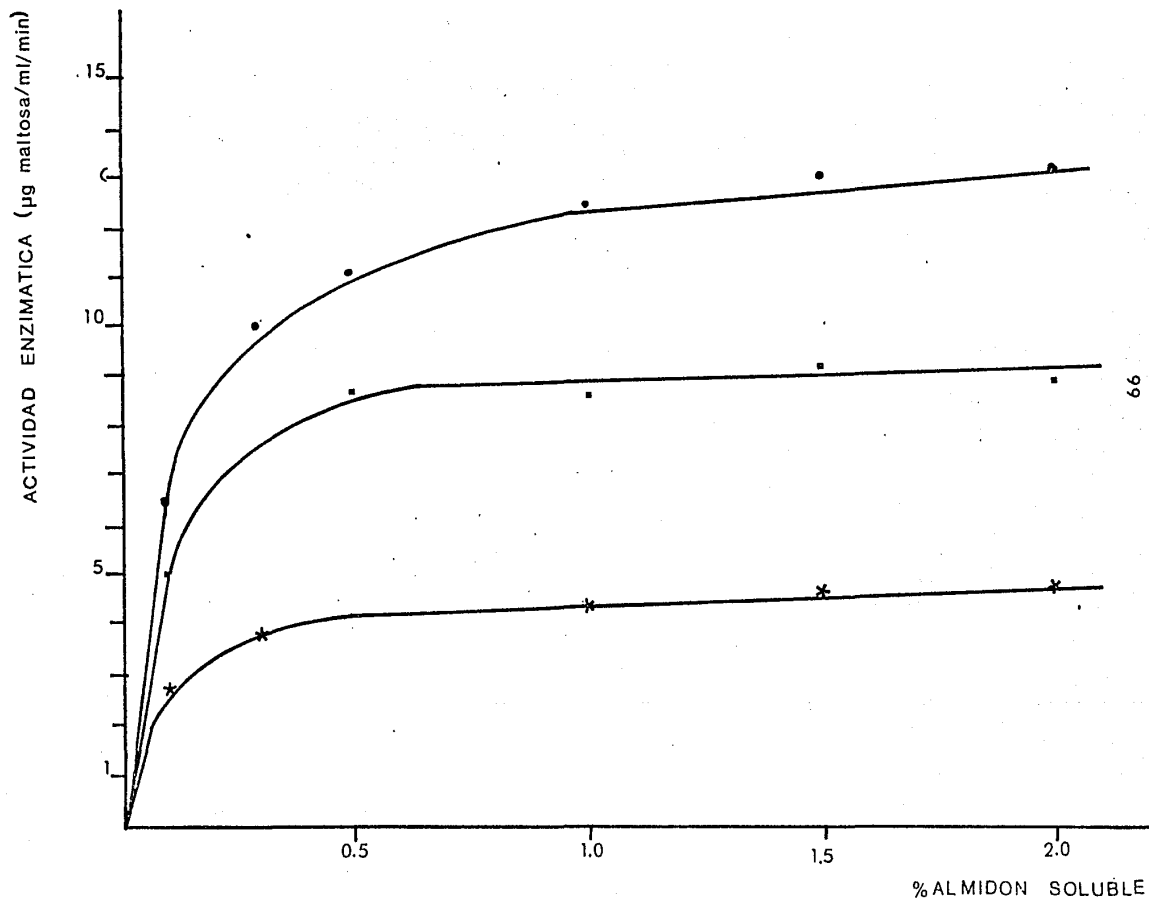


Fig. 12.- Representación de Lineweaver-Burk del efecto del inhibidor de maíz sobre amilasa de insecto.

Utilizando los recíprocos del efecto del inhibidor de maíz H-28 sobre la actividad de la amilasa del insecto Tribolium castaneum se construye la gráfica de Lineweaver-Burk. Se observa una inhibición de tipo Incompetitivo caracterizada por líneas paralelas con respecto a la gráfica sin inhibidor.

- (•) Sin inhibidor
- (▪)  $5.067 \times 10^{-9}$  M de inhibidor
- (★)  $2.53 \times 10^{-8}$  M de inhibidor

FIG.12.- REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK DEL EFECTO DEL INHIBIDOR DE MAIZ SOBRE AMILASA DE INSECTO

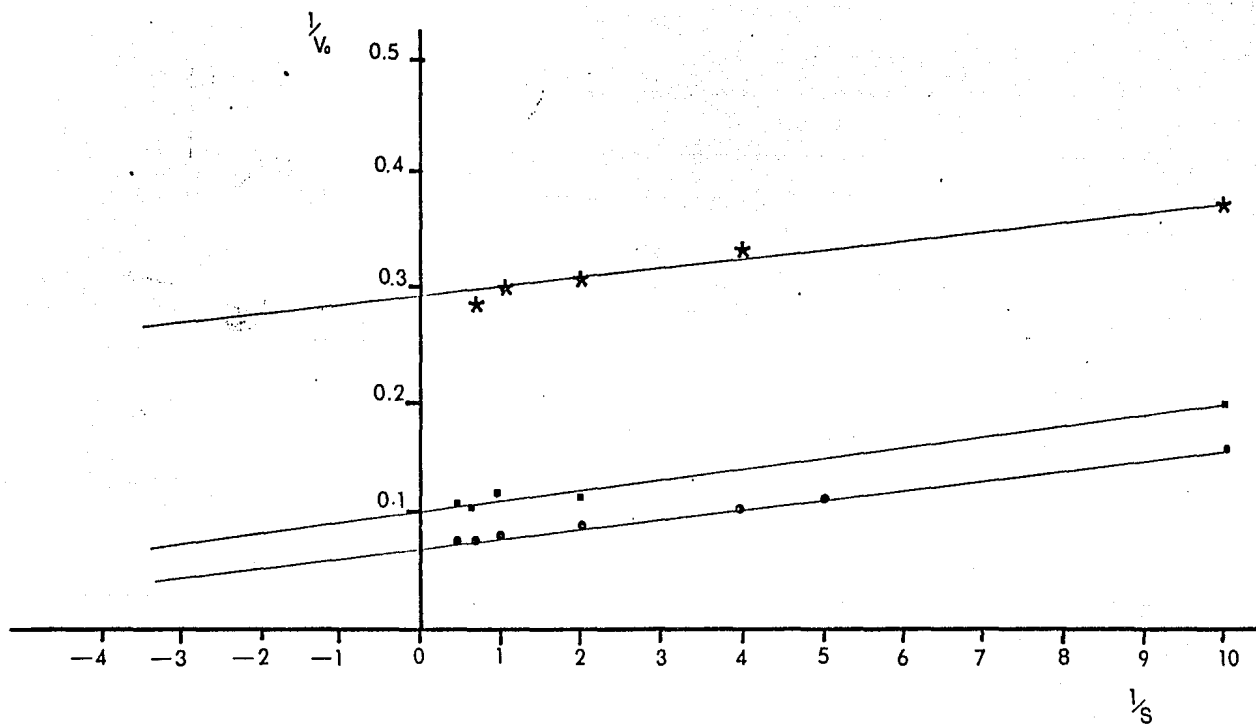
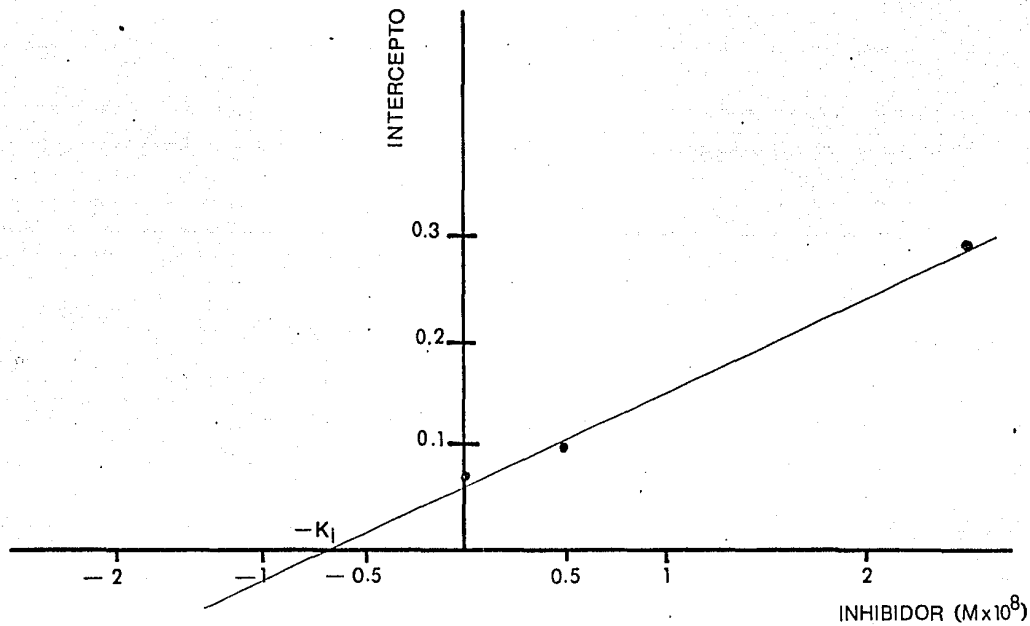


Fig. 13.- Regrafica del efecto del inhibidor de -  
maíz sobre amilasa de insecto.

Con los datos de interceptos de la representación  
de Lineweaver-Burk se construye la gráfica de los  
interceptos como función de la concentración del-  
inhibidor y se puede obtener la  $K_i$  como la absisa  
al origen.

FIG. 13.— REGRAFICA DEL EFECTO DEL INHIBIDOR DE MAIZ SOBRE  
AMILASA DE INSECTO



Como se muestra en la Tabla 7, el inhibidor es activo frente a su propia amilasa, esto es, la amilasa extraída de la semilla germinada durante cinco días.

Este inhibidor también fue activo frente a alfa-amilasa bacteriana, de Bacillus subtilis. Sin embargo, resultó ser inactivo frente a las amilasas salival humana y pancreática de porcino. Esto es de particular importancia ya que en previas investigaciones acerca de la presencia de inhibidores de amilasa en maíz, se habían llevado a cabo usando alfa-amilasa salival (Kneen, E. y Sandstedt, R.M. - 1946). Esto puede explicar el hecho de que ellos hayan fallado en detectar cualquier actividad inhibitoria en maíz. Por otra parte, resulta interesante el que la amilasa humana no se vea afectada ya que la inactivación de esa amilasa podría tener consecuencias de tipo antinutricional.

Este inhibidor también resultó ser activo frente a las alfa-amilasas de tres diferentes insectos que atacan a los cereales en almacenamiento, Tribolium castaneum (escara bajo rojo de los granos), Sitophilus zeamais (gorgojo del maíz) y Rhizopertha dominica (horadador menor de los granos).

Al analizar la susceptibilidad de las amilasas que son afectadas por el inhibidor encontrado en el maíz H-28,-

midiendo la inhibición de soluciones que digieren cantidades semejantes de almidón, se determinó la inhibición relativa, encontrando que la alfa-amilasa del insecto Tribolium castaneum fue la más sensible, asignándosele el 100% de inhibición relativa, en seguida, con una inhibición relativa del 40% se encontró la alfa-amilasa de Bacillus subtilis, y por último, las amilasas del maíz H-28 con cerca del 20%. (Fig. 14).

Cuando el inhibidor fue probado frente a las amilasas extraídas de otros granos en germinación, distintos al maíz, no se encontró actividad. Así fué inactivo frente a las amilasas de trigo, cebada, centeno, triticale, o sorgo. Alfa-amilasa de Aspergillus oryzae y beta-amilasa de cebada tampoco fueron inhibidas.

TABLA No. 7.- Especificidad de la inhibición de diferentes amilasas por el maíz H-28.

AMILASAS INHIBIDAS	AMILASAS NO INHIBIDAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>- amilasa bacteriana (<u>Bacillus subtilis</u>)</li> <li>- amilasas de maíces a 5 días de germinación               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cristalino</li> <li>- Bofo</li> <li>- Apachito</li> <li>- F-2</li> <li>- Pal-tol</li> <li>- Coníco</li> <li>- Dulce</li> <li>- Chapalote</li> <li>- H-28</li> <li>- Gordo</li> </ul> </li> <li>- amilasas de insectos que atacan a cereales en almacenamiento               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Tribolium castaneum</u></li> <li>- <u>Ryzopertha dominica</u></li> <li>- <u>Sitophilus zeamais</u></li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- amilasa salival (humana)</li> <li>- amilasa pancreática (porcino)</li> <li>- amilasa fungica (<u>Aspergillus niger</u>).</li> <li>- amilasas totales de trigo</li> <li>- alfa amilasa de trigo</li> <li>- amilasas totales de centeno</li> <li>- alfa amilasa de centeno</li> <li>- amilasas totales de cebada</li> <li>- alfa amilasas de cebada</li> <li>- amilasas totales de triticale</li> <li>- alfa amilasas de triticale</li> <li>- amilasas totales de sorgo</li> <li>- alfa amilasas de sorgo</li> <li>- beta amilasa de cebada</li> </ul>



Fig. 14.- Inhibición relativa de las amilasas sen-  
sibles.

Soluciones amilolíticas de diferentes orígenes ca-  
paces de degradar cantidades semejantes de almi-  
dón, se colocaron frente a la misma cantidad de -  
inhibidor purificado, determinando la disminución  
degradativa del almidón. A la mayor disminución-  
se le dió el valor de 100% y con respecto a este-  
se calcularon los valores restantes.

H-28 $\Delta$  - Amilasas del maíz H-28 a 5 días  
de germinación calentado 10 min  
a 70°C.

H-28 - Amilasas del maíz H-28 a 5 días  
de germinación.

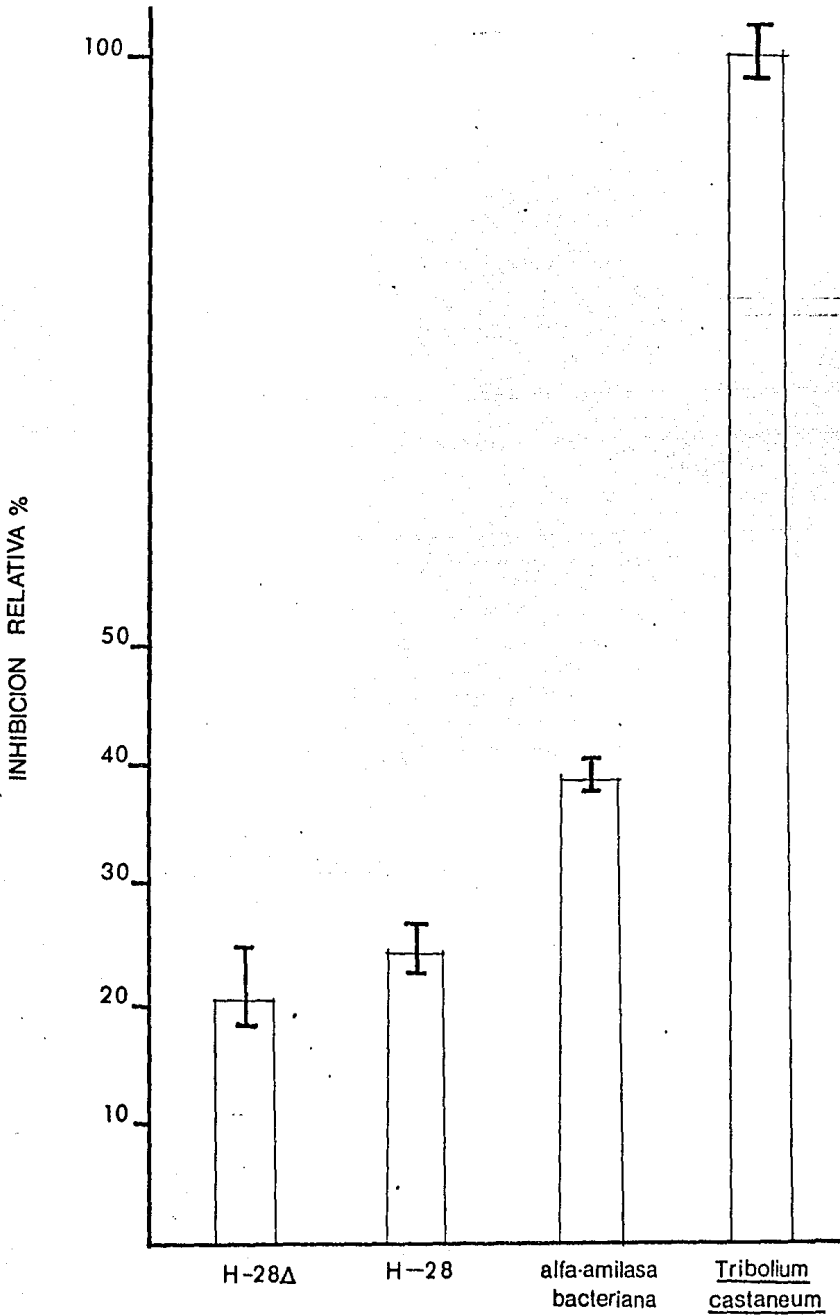
Alfa-amilasa

Bacteriana - alfa-amilasa de Bacillus subtilis

Tribolium

Castaneum- Amilasas del insecto Tribolium  
castaneum adulto.

FIG.14.- INHIBICION RELATIVA DE LAS AMILASAS SENSIBLES



## DISCUSION

El papel fisiológico del inhibidor de amilasas ha ba sido anteriormente relacionado a un mecanismo de defensa principalmente contra insectos, y debido a que no se haba encontrado inhibición frente a las mismas amilasas producidas por la planta de que se obtiene, no se había considerado ningún papel fisiológico de control en el metabolismo del almidón en la planta. La única excepción había sido reportada por Warchalewski, J.R. (1977b) quién mostró actividad inhibitoria del inhibidor de amilasas presente en trigo, frente a las amilasas del mismo trigo. Sin embargo, previos reportes también con trigo, por Kneen, E. y Sanstedt.-R. M. (1943, 1946). Shainkin, R. y Birk; Y. (1970) resultancontradictorios, ya que ellos no encontraron actividad inhibitoria frente a, alfa-amilasa de trigo.

El hecho de que el inhibidor de amilasas presente en maíz sea capaz de inhibir sus propias amilasas provee -- una nueva posibilidad de atribuirle un papel fisiológico al inhibidor durante la germinación, interviniendo así como -- un fino control secundario de la actividad amilolítica del grano, ya que la presencia o ausencia de la enzima puede -- ser controlada por otros métodos como síntesis y degradación, mientras que los inhibidores pueden ser utilizados -- primeramente como 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 tejido solo se requiere una regulación secundaria muy pequeña.

En años recientes se han reportado varios inhibidores o inactivadores específicos de enzimas. Algunos de ellos son proteasas específicas (Wallace, W 1973, 1974) y sólo unos cuantos son reversibles (Brewin, N.S. y Northcote, D.A. 1973). Este es un punto importante, ya que las rápidas fluctuaciones en la actividad enzimática sólo pueden ser reguladas por inhibidores si el proceso de inhibición es reversible.

La regulación de la actividad enzimática por inhibidores específicos de enzimas presenta ventajas teóricas en organismos multicelulares diferenciados en los cuales las velocidades de síntesis y degradación de proteínas son relativamente bajas. Schimke, R.T. (1973) ha reportado que sólo cuando una enzima se intercambia rápidamente puede cambiar la relación de síntesis /o degradación, resultando en fluctuaciones rápidas de la actividad enzimática. Así, si las fluctuaciones rápidas en las actividades de importantes enzimas regulatorias puede sólo ser controlada por velocidades alteradas de síntesis de enzima, éstas necesitan recambiarse rápidamente. En el contexto de una célula vege

tal madura, este rápido intercambio puede ser un gasto de energía inútil, y, en cuyo caso, sería más económico mantener a las moléculas enzimáticas en un estado inactivo por la acción de inhibidores específicos que puedan ser separados, modificados o degradados en respuesta a cambios metabólicos o del medio ambiente..

Por otro lado, Kruger, J. E. (1976) ha mostrado que la presencia de actividad amilolítica puede producir serios problemas en granos de trigo, Así como en la obtención de productos de éstos, ya que produce cambios significativos en sus propiedades físicas. En particular, es posible que los eventos bioquímicos de la hidrólisis del almidón, asociados con el fenómeno de brotamiento o germinación prematura en los cereales, pueda también ser prevenida total o al menos parcialmente por la presencia de estos inhibidores de amilasas.

Es de esperarse que los presentes resultados, puedan abrir nuevas posibilidades para que los programas de los fitomejoradores, en su intento por obtener nuevas variedades de semillas con mejor resistencia a la germinación prematura, así como al ataque de pestes o quizá con mejores características relacionadas con la germinación o el almacenamiento de granos, pueden valorarse con este tipo de parámetros bioquímicos en la evaluación de sus resulta-

dos, promoviendo de esta forma una mejor interrelación entre los diversos programas científicos relacionados con la agricultura.

Finalmente, es nuestra hipótesis que únicamente con un mejor conocimiento de nuestros materiales agronómicos -- más importantes, se podrá lograr un mejor aprovechamiento -- de éstos, así como la colaboración en programas de mejoramiento más específicos en la difícil tarea de mejorar la -- producción de alimentos para poder satisfacer las necesidades alimentarias cada vez más crecientes.

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

- Applebaum, S.W. 1964. *J. Insect Physiol.* 10, 897 - 906
- Applebaum, S.W. y Konijn, A.M. 1965. *J. Nutr.* 85, 275 - 281
- Bearden, J.C. Jr. 1978. *B.B. Acta.* 533, 525 - 529
- Bernheimer, A.W. y Steele, J.M. 1955. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83, 123 - 126
- Bowman, D.E. 1943. *Science.* 98 (2544), 308 - 309
- Bowman, D.E. 1945. *Science.* 102, 358 - 359
- Brewin, N.J. y Northcote, D.A. 1973. *B.B. Acta.* 320, 104 -- 118.
- Buonocore, V., Petrucci, T. y Silano, V. 1977. *Phytochemistry.* 16, 811 - 820.
- Davis, B.J. 1964. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A. y - Smith, F. 1956. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Elliot, B.B. y Leopold. A.C. 1953. *Physiol. Plantarum.* 6, - 65.
- Fisher, M.L., Anderson, A.J. y Albersheim, P. 1973. *Plant. Physiol.* 51, 489-491
- Fossum, K. y Whitaker, J.R. 1974. *J. Nutr.* 104. 930-936.
- Frommer, W., Plus, W., Schafer, D. y Schmidt, D. 1972. *German Offen.* 2, 064, 092.
- Granum, P.E. y Whitaker, J.R. 1977. *J. Food. Biochem.* 1, - 385-401.
- Hemberg, T. y Larsson, I. 1961. *Physiol. Plantarum.* 14, 861.
- Hemberg. T. 1975. *Physiol. Plantarum.* 35, 11-15.
- Hernández, A. y Jaffé, W.G. 1968. *Acta Científica Venezolana.* 19, 183-185.

- Hopkins, R.H. y Bird, R. 1954. *Biochem. J.* 56, 86-96.
- Hotta, Y. y Bassel, A. 1965. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 53, - -  
356-362.
- Iturbe-Ch., F.A. 1976. Tesis Profesional. Fac. de Química.-  
U.N.A.M.
- Jaffé, W.G. y Vega-Lette, C.L. 1968. *J. Nutr.* 94, 203-210.
- Jaffé, W.G., Moreno, R. y Wallis, V. 1973. *Nutr. Rep. Inter.*  
7 (3), 169-174.
- Jaffé, W.G. y Flores, M.E. 1975. *Arch. Latinoamericano de -  
Nutrición.* XXV (1), 79-90.
- Kneen, E. y Sandstedt, R.M. 1943. *J. Am. Chem. Soc.* 65, - -  
1247.
- Kneen, E. y Sandstedt, R.M. 1946. *Arch. Biochem.* 9, 235-249.
- Kruger, J.E. 1976. *Proc. First Int. Sprouting Symposium.* 4-  
(2), 187-194.
- Lang, J.A., Chang-Hum, L.E., Reyes, P.S. y Briggs, G.M. - -  
1974 *Fed. Proc.* 33 (718), 2870.
- Loyter, A. y Scharamm, M. 1962. *Biochem. Biophys. Acta.* 65,  
200-206.
- Mandels, M. y Reese, E.T. 1965. *Ann. Rev. Phytopathol.* 3, -  
85-102.
- Marshall, J.J. y Lauda, C.M. 1975a. *Die Stärke.* 27 (8), 274-  
278.
- Marshall, J.J. y Lauda, C.M. 1975b. *J. Biol. Chem.* 250 (20),  
8030-8037.
- Marshall, J.J. 1975c. *A.C.S. Symposium Series.* No. 15.
- Mattoo, A.K. y Modi, V.V. 1970. *Enzymologia.* 39, 237-247.
- Militzer, W., Ikeda, C. y Kneen, E. 1946a. *Arch. Biochem.* -  
9, 309-320.
- Militzer, W., Ikeda, C. y Kneen, E. 1946b. *Arch. Biochem.* 9,  
321-329.
- Miller, B. y Kneen, E. 1947. *Arch. Biochem.* 15, 251-254.



- Murao, S. y Ohyama, K. 1975. *Agr. Biol. Chem.* 39 (11), - -  
2271-2273.
- Nelson, N. 1944. *J. Biol. Chem.* 153, 375-382.
- Niwa, T., Inaue, S., Tsuruoka, T., Koaze, T. y Niida, T. -  
1970. *Agr. Biol. Chem.* 34, 966.
- Petrucci, T., Tomasi, M., Cantagalli, P. y Silano, V. 1974.  
*Phytochemistry.* 13, 2487-2495.
- Petrucci, T., Rab, A., Tomasi, M. y Silano, V. 1976. *B.B. -  
Acta.* 420, 288-297.
- Powers, J.R. y Whitaker, J.R. 1977a. *J. Food. Biochem.* 1, -  
217-238.
- Powers, J.R. y Whitaker, J.R. 1977b. *J. Food. Biochem.* 1, -  
239-260.
- Pressey, R. 1967. *Plant Physiol.* 42, 1780-1786.
- Rao, M.N., Shurpalekar, K.S. y Sundaravalli, O.E. 1967. *Indian J. Biochem.* 4, 185.
- Rayan, C.A. 1973. *Ann. Review Plant Phys.* 24, 176-196.
- Rinderknecht, H., Geolas, M.L., Silverman, P. y Haverbach, -  
B.L. 1968. *Clin. Chem. Acta.* 21, 197.
- Saunders, R.M. y Lang, J.A. 1973. *Phytochem.* 12, 1237-1241,
- Savaiano, D.A., Powers, J.R., Castello, M.J., Whitaker, J.-  
R. y Clifford, A.J. 1977. *Nutr. Reports Inter.* 15  
(4), 443-449.
- Schimke, R.T. 1973. *Adv. Enzymol.* 37, 135-187.
- Schmidt, D. y Plus, W. 1971. *Chem. Abs.* 75, 183. *Pharmaceu-  
ticals* 91296p.
- Shainkin, R. y Birk, Y. 1965. *Israel J. Chem.* 3, 96p.
- Shainkin, R. y Birk, Y. 1967. *Israel J. Chem.* 5, 129p.
- Shainkin, R. y Birk, Y. 1970. *B.B. Acta.* 221, 502-513.
- Silano, V., Pocchiati, F. y Kasarda, D.D. 1973. *B.B. Acta.-  
317, 139-148.*

- Silano, V., Furia, M., Gianfreda, N., Macre, A., Palessando, R., Rab. A., Scardi, V., Stella, E. y Valafre, F. 1975. B.B. Acta. 391, 170-178.
- Sodini, G., Silano, V., De Agazio, M., Pocchari, F., Tentori, L. y Vivaldi, G. 1970. Phytochem. 9, 1167-1172.
- Stankovic, S.C. y Markovic, M.D. 1963, Chem. Abs. 59, 3084d.
- Strumeyer, D.H. y Malin, M.J. 1969. B.B. Acta. 184, 643-645.
- Strumeyer, D.H. 1972. Nutr. Reports Inter. 5, 45-52.
- Sukurukov, I.E., Kling, E. y Oucharov, K. 1938. Chem. Abs.-32, 6686-4.
- Ueda, S., Koba, Y. y Chaen, H. 1978. Carbohydrate Res. 61, 253-264.
- Wallace, W. 1973. Plant. Phys. 52, 197.
- Wallace, W. 1974. B.B. Acta. 341, 265.
- Warchalewski, J.R. 1977a. Bull. De L'académie Polonaise Des-Sciences. XXV (11), 725-729.
- Warchalewski, J.R. 1977b. Bull. De L'académie Polonaise Des-Sciences. XXV (11), 731-735.
- Weber, K. y Osborn, M. 1969. J. Biol. Chem. 244 (16), 4406-4412.
- Yetter, M.A., Saunders, R.M. y Boles, H. 1979. Cereal Chem. 56 (4), 243-244.