

UNIVERSIDAD DE SONORA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS

**Aislamiento y Caracterización Parcial de Isoamilasas de
Rhyzopertha dominica Fab. (Coleoptera: Bostrichidae)**



TESIS

que para obtener el Título de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Fernando Iván Díaz Malvárez

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	vi
OBJETIVOS.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
Cereales.....	3
Trigo.....	4
Producción de trigo.....	5
Pérdidas de granos y cereales.....	7
Pérdidas de granos.....	7
Pérdida de granos poscosecha.....	7
Pérdidas por insectos.....	8
Métodos de control de insectos de granos almacenados.....	10
Control químico.....	10
<i>Rhyzopertha dominica</i> Fab.....	11
Descripción.....	11
Alimento.....	11
Distribución.....	13
Biología.....	13
Importancia.....	13
Amilasas.....	14
Clasificación de enzimas amilásicas.....	14
Digestión de almidón.....	17

Aplicación de enzimas α -amilásicas en la industria.....	19
Purificación de enzimas.....	19
Precipitación salina.....	21
Diálisis.....	22
Cromatografía de filtración en gel.....	22
Cromatografía de Interacción hidrofóbica.....	23
Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	26
Conceptos del protocolo de purificación.....	27
 MATERIALES Y MÉTODOS.....	 29
Aislamiento de la actividad enzimática.....	29
Cultivo de insectos.....	29
Obtención de extractos enzimáticos de <i>Rhizopertha dominica</i>	29
Precipitación fraccionada con sulfato de amonio.....	30
Cromatografía de interacción hidrofóbica.....	31
Diálisis.....	32
Determinación de actividad amilolítica.....	32
Determinación de proteína.....	33
Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	34
Electroforesis disociante.....	34
Detección de proteína con tinción de plata.....	35
Caracterización enzimática.....	35
Determinación del pH óptimo.....	36
Efecto de la temperatura en la actividad amilásica.....	36
Efecto del mercaptoetanol sobre la actividad amilásica.....	36
Determinación de parámetros cinéticos.....	37
Determinación de amilosa residual.....	38
Producción de azúcares reductores.....	39
Acción de inhibidores de trigo sobre las isoamilasas de <i>R. dominica</i>	 39

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
Precipitación fraccionada con sulfato de amonio.....	41
Cromatografía en fenil sefarosa CL-4B.....	43
Purificación de α -amilasas.....	46
Determinación de parámetros cinéticos.....	48
Patrón de acción de las isoamilasas.....	51
Determinación del pH óptimo.....	54
Estabilidad térmica.....	56
Influencia del β -mercaptetanol sobre la actividad amilásica.....	56
Acción de inhibidores de trigo sobre las isoamilasas de <i>R. dominica</i>	58
CONCLUSIONES.....	63
RECOMENDACIONES.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	66

LISTA DE FIGURAS

No		
1	Zonas de producción de trigo en México en 2005.....	6
2	Adulto y larva de <i>Rhizopertha dominica</i> Fab.....	12
3	Digestión secuencial de la amilopectina por acción de la α -amilasa y la $\alpha(1-6)$ -glucosidasa.....	18
4	Fundamento de la cromatografía de interacción hidrofóbica.....	24
5	Análisis electroforético de las fracciones cromatográficas obtenidas de la cromatografía de interacción hidrofóbica.....	42
6	Cromatografía de fenil sefarosa CL-4B de un extracto amilolítico de <i>R. dominica</i>	44
7	Relación entre el cambio concentración de amilosa residual y concentración de azúcares reductores producida por la acción amilolítica de tres isoamilasas de <i>Rhizopertha dominica</i>	52
8	Influencia del pH en la actividad isoamilásica de <i>R. dominica</i> usando almidón soluble como sustrato.....	55
9	Estabilidad térmica de las isoamilasas de <i>Rhizopertha dominica</i> a 50°C y 60°C.....	57
10	Influencia del β -mercaptoetanol sobre la actividad de las isoamilasas de <i>Rhizopertha dominica</i>	59
11	Actividad residual ante la inhibición de albúminas de trigo Rayón para IA de <i>Rhizopertha dominica</i>	61

LISTA DE TABLAS

No.

- 1 Etapas de purificación de la actividad amilolítica de *Rhizopertha dominica*..... 47
- 2 Valores de parámetros cinéticos de α -amilasas de *Rhizopertha dominica* empleando distintos sustratos..... 49

RESUMEN

Se aislaron tres isoamilasas de *Rhyzopertha dominica* (denominadas IA-0.70, IA-0.79 y IA-0.90, de acuerdo a su movilidad relativa en PAGE), mediante concentración fraccionada con sulfato de amonio seguida de una cromatografía en columna en fenil sefarosa CL-4B. Las IA-0.70 y IA-0.79 mostraron un pH óptimo de 7.0, mientras que para la IA-0.90 fue de 6.5. Las tres IA presentaron estabilidad a 50°C por 1 hora, pero a 60°C se perdió el 50% de actividad a los 20 minutos de incubación y se inactivaron en una hora. Las IA-0.70 y IA-0.79 son inhibidas con fracciones de albúminas de un trigo hexaploide (variedad Júpate), mientras que la IA-0.90 fue altamente resistente a la inhibición. El β -mercaptoetanol en concentraciones superiores a 30 mM incrementa 2.5 veces más la actividad amilolítica de las tres isoamilasas, usando almidón de trigo como sustrato. El patrón de acción de las tres isoamilasas fue el típico de las endoamilasas, sin embargo se observaron diferencias en la eficiencia hidrolítica medida bajo el coeficiente V_{max}/K_m , en almidón, amilopectina y amilosa. La acción hidrolítica de la IA-0.90 en almidón y amilopectina ($V_{max}/K_m=75.0$ y 56.3 , respectivamente) fue menos eficiente que en amilosa ($V_{max}/K_m=240.2$). La IA-0.70 hidroliza al almidón y a la amilosa en rangos similares ($V_{max}/K_m=203$ en promedio), pero en amilopectina no fue tan eficiente ($V_{max}/K_m=123.6$) la suma de resultados sugiere que las IA-0.70 y IA-0.79 pertenecen a un grupo de isoamilasas sacarificantes que hidrolizan fragmentos de oligosacáridos provenientes de la acción hidrolítica de la IA-0.90. La acción simultánea de las tres isoamilasas en almidón, así como la alta resistencia de la IA-0.90 a los inhibidores de trigo, podría facilitar al insecto a reproducirse y alimentarse de los granos de trigo durante el almacenamiento.

OBJETIVOS

Objetivo General

- ❖ Caracterización parcial de isoamilasas de *Rhizopertha dominica* Fab.

Objetivos específicos

- ❖ Aislamiento y purificación de las enzimas α -amilásicas de *Rhizopertha dominica*
- ❖ Determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , y patrón de acción de las isoamilasas
- ❖ Determinar el pH óptimo, estabilidad térmica, influencia del β -ME de las isoamilasas de *R. dominica*
- ❖ Determinar el efecto de inhibición de actividad amilásica de las proteínas de un grano entero de trigo hexaploide.

INTRODUCCIÓN

El estado de Sonora es la entidad federativa con mayor producción de trigo, aportando el 34.7% de la producción nacional con 1, 049,975 toneladas de trigo para el año agrícola 2005, teniendo un valor comercial de \$1 697 millones (INEGI, 2006). Este alto volumen requiere ser almacenado antes, durante y después de su comercialización.

Debido a que muchos de los sistemas de almacenamiento poseen estructuras físicas inapropiadas e insuficientes, los granos son susceptibles al ataque de diversas plagas. Las estimaciones de pérdidas de granos por insectos en países de Latinoamérica es del 10 al 30% de la cosechado (FAO, 1999). Estudios realizados por Wong *et al.* (1987) indican que *Rhizopertha dominica* es la plaga de mayor distribución e importancia en el Estado de Sonora.

Para abatir las pérdidas de los granos almacenados y mantener la calidad alimentaria de los mismos es necesario comprender el mecanismo de acción que el insecto tiene para utilizar el sustrato y alimentarse del mismo. Se sabe que *R. dominica* cuenta con un sistema enzimático abundante en amilasas, que contribuyen a la digestión de su alimento. Conociendo esta dinámica se pueden plantear soluciones que disminuyan los daños causados a los granos por este insecto, basándose en el conocimiento del patrón de acción de sus isoamilasa sobre el sustrato.

Estudios realizados han demostrado que existen inhibidores de la enzima α -amilasa, de naturaleza proteica, capaces de inhibir la actividad amilolítica de *R. dominica*, pero también se ha encontrado que algunas enzimas amilolíticas presentan mayor resistencia a dichos inhibidores. (Baker, 1991; Alanis-Villa, 2006).

Este trabajo propone el aislamiento, purificación y caracterización parcial de las enzimas α -amilásicas del insecto *Rhyzopertha dominica* como parte de una línea de investigación sobre el estudio de las propiedades de dichas enzimas con el fin de comprender la forma en que hidrolizan a la fracción carbohidrato del grano del trigo.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Cereales

Los cereales constituyen un conjunto de plantas de gran importancia para la humanidad, ya que son el alimento que contribuye con aporte energético y numerosos nutrientes para el organismo. Por esto los cereales han sido, son y seguirán siendo el principal sustento del hombre. Desde hace más de 24 siglos las culturas han estado estrechamente vinculadas con el cultivo y usos de los cereales; por ejemplo, el arroz ha sido el principal alimento del Medio Oriente, mientras que el mijo y el sorgo lo ha sido para países de África y algunos asiáticos. En Europa, desde las culturas más primitivas hasta las modernas sociedades de la actualidad han dependido tradicionalmente del trigo, centeno y cebada. En el nuevo mundo, el maíz es el elemento de primer orden para el desarrollo de las culturas Meso y Sudamericanas; y sigue siendo el principal y más abundante alimento para los habitantes de América Latina (Serna, 1996).

La importancia de los cereales radica en que contienen nutrientes en forma concentrada, son fáciles de almacenar, son fáciles de transportar, se conservan por mucho tiempo, se transforman con facilidad en otros alimentos y se les puede utilizar como materia prima o como producto elaborado (CAMINOLT, 2007). El cultivo de cualquier cereal es relativamente sencillo y de bajo costo. Por ello, todas las civilizaciones que han habitado el planeta han tomado a los cereales como fuente de vitaminas, minerales, proteínas, y otros nutrientes. Los principales cereales que se consumen son el trigo, el arroz, el maíz, el centeno, la cebada, la avena y el mijo.

Trigo

El trigo, como todos los cereales, pertenece a la familia de las gramíneas, la más importante del mundo desde los puntos de vista económico y ecológico, ya que la superficie de suelo que es dedicada al cultivo de las gramíneas es mayor que la suma de todas las demás especies de alimentos cultivados (Serna, 1996); por consiguiente, una deficiencia, incluso pequeña, de la cosecha de cualquiera de ellas puede provocar hambruna e inestabilidad económica en zonas muy amplias.

El trigo generalmente es transformado en harina, y ésta es destinada principalmente a la fabricación de pan, galletas, pasteles, tortillas, pastas para sopa y otros productos. Uno de los elementos nutritivos más importantes es la proteína, misma que se encuentra contenida en el gluten, el cual facilita la elaboración de levaduras de alta calidad, necesarias para la panificación. El trigo de menor calidad se utiliza para la elaboración de bebidas alcohólicas y alimentación animal. Igualmente los subproductos de la molienda (salvado, salvadillo, etc.) se utilizan como alimento forrajero, o para la elaboración de otros alimentos humanos con alto contenido de fibras.

El valor nutritivo del trigo y de los productos derivados de sus harinas, siempre han sido una fuente importante de alimento para la humanidad, ya que aportan energía, proteína, vitaminas y minerales, muy necesarios para el crecimiento sano de la población (CAMINOLT, 2007).

Los trigos pertenecen al género *Triticum*, dentro del cual se conocen 30 especies, algunas de ellas cultivables y otras silvestres. Las especies son divididas en tres subgrupos, en base al número de cromosomas de sus células reproductoras: diploide, tetraploide y hexaploide.

Producción de trigo

Según datos de la FAO, los principales países exportadores de trigo a nivel mundial son Argentina, Australia, Canadá, Estados Unidos y la comunidad Europea. La producción de trigo representa la tercera parte de los cereales sembrados a nivel mundial la producción anual de trigo a nivel global asciende a 592 millones de toneladas. China produce el 19%, Estados Unidos e India 11% cada uno, Francia y Rusia el 6% mientras que Canadá y Australia generan el 4% individualmente. En conjunto dichas naciones producen el 67%, mientras que China, Estados Unidos e India suman el 41% del total mundial. (FAO, 2005).

Según datos del INEGI (2006), para el año 2005 la producción de hectáreas cosechadas de cultivos cíclicos correspondió 18, 528,491 Ha. a nivel nacional, de las cuales 634,548 ha corresponden a las sembradas para trigo, correspondiéndole el 4.4 del total nacional.

En cuanto a la producción de trigos por Entidades Federativas a nivel nacional, el Estado de Sonora ocupa el liderazgo en producción, generando el 34.7% del total nacional. Según los datos oficiales, los principales productores de trigo para el 2005 son Sonora, Guanajuato (23.1%), Baja California (16.2) y Michoacán (6.6%) (INEGI, 2006). Históricamente, en la década del 90 al 2000, el Estado de Sonora es líder en la producción nacional con un 35% de la producción, seguida por Guanajuato (17.5%), Baja California (11.5%), Sinaloa (9.2%), Michoacán (6.4%) y Jalisco (4.4%) (INEGI, 2006).

La región noroeste del país (Sonora, Sinaloa, Baja California Norte y Sur) aportan el 55% de la producción nacional de trigo y el Bajío (Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Querétaro) el 35%.



Fig. 1. Zonas y producción de trigo en México en 2005.
Fuente: CAMINOLT, 2007.

Pérdidas de granos y cereales

Se calcula que en países desarrollados las pérdidas de granos y cereales son alrededor del 10 al 15%; mientras que en otras regiones como África y Latinoamérica se llegan a alcanzar pérdidas hasta del 50% con respecto a lo cosechado (FAO, 1999).

Pérdidas de granos. Los productos de cultivos pueden perderse en cualquiera o todas las fases de la cadena alimentaria, desde la plantación hasta la preparación para el consumo inmediato. En general se han identificado tres periodos:

- a. Pérdidas anteriores a la cosecha: son las que suceden antes de que comience el proceso de recolección y pueden deberse a factores tales como insectos, malas hierbas y enfermedades que afectan a los cultivos.
- b. Pérdidas durante la cosecha: son las que se registran durante el proceso de recolección y pueden deberse, por ejemplo, a la rotura de la planta y la consiguiente separación del grano de la espiga y su derramamiento.
- c. Pérdidas poscosecha: son las que se registran en el periodo posterior a la cosecha.

Pérdida de granos poscosecha

Por el término período poscosecha se entiende al intervalo de tiempo entre la madurez del cultivo y su consumo. Por pérdida de alimentos se entiende a toda variación de disponibilidad, comestibilidad, salubridad o calidad del alimento que hace reducir su valor para el hombre; esta definición no contempla el origen de la pérdida de calidad del alimento, pero abarca cualquier restricción que impida al uso del producto para consumo humano, sin importar que posteriormente sea destinado a consumo animal. Desde un punto

de vista económico, la suma de las pérdidas en cantidad y calidad significan, inevitablemente, la pérdida de dinero, lo que repercute en el crecimiento de la producción y el beneficio al agricultor.

Dentro de los factores que se pueden contemplar que causen pérdidas de producto son: cosechas tardías; pérdidas por ataques de pájaros y otras plagas; insuficiencia de secado del grano que pueda generar ataque de hongos e insectos; grano quebrado durante el trillado; condiciones pobres de almacenamiento que causen pérdidas por hongos, insectos, roedores y otras plagas; condiciones de transporte o defectuoso empaque de grano que genere pérdida cuantitativa del producto; malas prácticas de comercialización, políticas sectoriales y aspectos socio-económicos.

Los principales agentes que causan el deterioro de los granos almacenados son:

- microorganismos (hongos, bacterias y levaduras)
- insectos y ácaros
- roedores
- pájaros

Perdidas por Insectos. Las estimaciones de las pérdidas consiguientes varían mucho según el producto, la localidad y las prácticas de almacenamiento. Para los cereales o las leguminosas de grano de zonas tropicales, almacenados en condiciones tradicionales, puede esperarse una pérdida del 10-30 por ciento durante toda una temporada de almacenamiento (FAO, 1985).

En los productos de cultivos se encuentran muchas especies de insectos, pero son sólo unas cuantas las que producen deterioros y pérdidas. Algunas pueden ser incluso beneficiosas porque atacan a otras plagas de insectos. Es importante poder identificar exactamente las principales especies de insectos para evaluar sus efectos en el producto almacenado y establecer las medidas de control necesarias.

En México hay más de 25 especies de importancia económica que atacan a granos almacenados y sus productos. Las que mayor daño ocasionan a los granos y a las harinas, son aproximadamente 15 especies, pertenecientes a los órdenes Coleoptera y Lepidoptera (Sifuentes, 1979).

Los insectos que atacan al grano almacenado se agrupan en 2 clases de plagas: primarias y secundarias. Las primarias son aquellas que atacan al grano, se alimentan del endospermo y completan su metamorfosis en el interior del grano, ejemplos: el barrenador menor de los granos (*Rhyzopertha dominica* F.), la palomilla de los granos (*Sitotroga cerealella*), gorgojo del arroz (*Sitophilus oryza* L.), gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* M.), el gorgojo granero (*Sitophilus granarius* L.), mientras que las plagas secundarias se alimentan principalmente de las impurezas, grano dañado o tamos, del germen y de granos dañados por insectos primarios; algunos ejemplos son: el gorgojo de las harinas (*Tribolium confusum* J. y *Tribolium castaneum* H), *Tenebroides mauritanicus* L, gorgojos aserrados (*Orizaephilus surinamensis* L); estas especies son indicadores que existen plagas primarias (González, 1995).

Métodos de control de insectos de granos almacenados

Los métodos de control pueden definirse como la aplicación de prácticas y/o técnicas que tienen como objetivo fundamental abatir una población de insectos, previamente a que éstos rebasen el umbral económico de daño y su costo debe ser menor al daño económico previsto (Pacheco, 1985).

Dentro de los métodos de control de insectos se encuentran el químico, biológico, físico y mecánico, cultural, legal e integral (Morón y Terrón, 1988). Siendo el control químico y control biológico el más utilizado para el control del barrenador mayor de los granos (Markham *et al*, 1991).

Control químico. Los tratamientos con insecticidas y fumigantes son considerados como métodos de control químico. Un plaguicida se define como una sustancia o preparación química que se usa en el control o en algunos casos, para detener la acción de una plaga. Se pueden clasificar de acuerdo al organismo al que se dirige, al grupo funcional de la sustancia activa, en base a la formulación, a su presentación, entre otros (Mersch, 1985; López, 1985). Los insecticidas químicos para productos almacenados son de cuatro clases: fumigantes, preventivos, repelentes y residuales (Ouye, 1984).

La utilización indiscriminada durante décadas, han puesto en evidencia los problemas que generan, tales como: contaminación ambiental, disminución de la población de parásitos y depredadores, aparición de nuevas plagas que se consideraban secundarias, y un aumento creciente en la resistencia de los insectos a insecticidas y fumigantes (Zúñiga, 1985).

Los insecticidas más utilizados en granos almacenados y que han causado resistencia de manera intensa en algunos lugares, son el malatión, que es uno de los empleados por la alta toxicidad para los insectos y baja para el hombre; otro es el bromuro de metilo (CH_3Br), ampliamente utilizado desde 1930, es tóxico y altamente eficaz contra los insectos en estado adulto y larva, es altamente tóxico para humanos, ya que se adsorbe por la piel y pulmones; otro fumigante es la fosfina (PH_3) que se genera de tabletas de fosforo de aluminio (Serna, 1996).

***Rhyzopertha dominica* Fab.**

(Coleoptera: Bostrichidae)

Descripción. Cuerpo de forma cilíndrica, alargado, con la parte posterior redondeada y ligeramente truncada. Posee una cabeza retráctil dentro del protórax, con antenas cuyos tres últimos segmentos son marcadamente más grandes que los demás. Cuenta con un protórax más o menos circular, rugoso, debido a la existencia de pequeñas protuberancias. Este insecto es capaz de volar. Tiene 2.5 a 3 mm de largo y un color castaño a café oscuro. Su peso promedio es de 1.4 mg (Golebiowska, 1969).

Alimento. Tanto la larva como el adulto tienen preferencia por los cereales y sus productos. El insecto causa más daño en trigo (*Triticum aestivum* L.), maíz (*Zea mais* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.) (Rees, 2004). Rara vez infesta al grano en el campo antes de la cosecha (Edde, 2006). Generalmente no se desarrolla en semillas de oleaginosas y leguminosas.

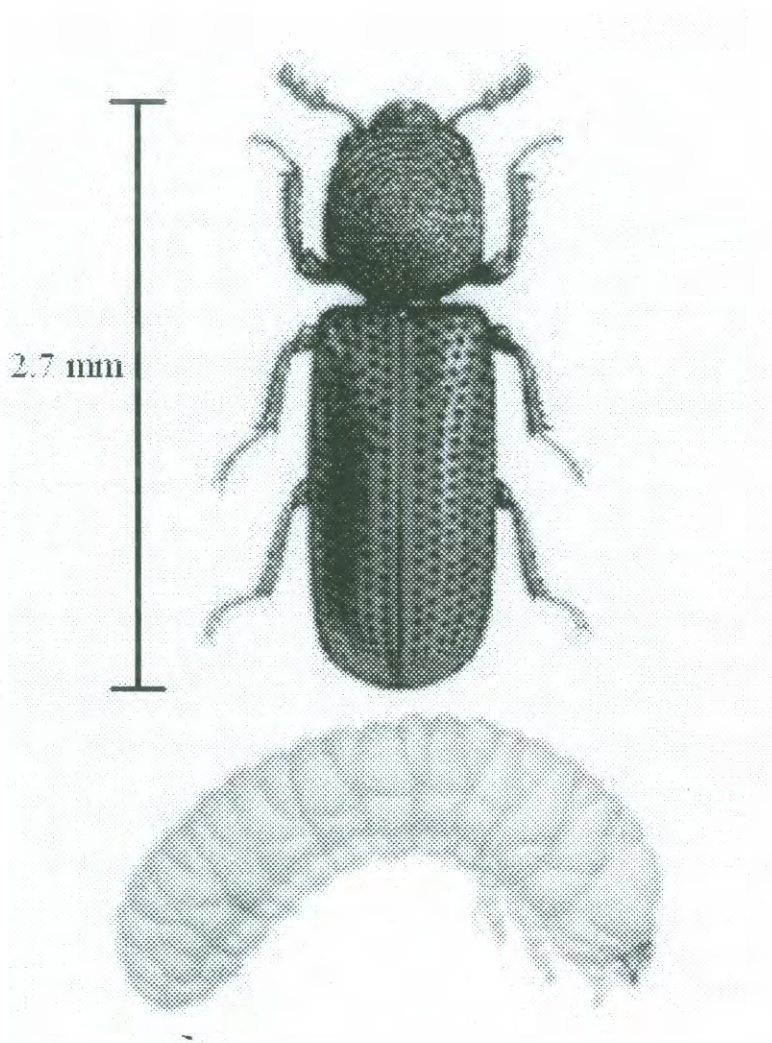


Fig. 2. Adulto y larva de *Rhyzopertha dominica* Fab.
Fuente. www.montana.edu/wwwai/imsd/vanessa/lab.html

Distribución. Actualmente *R. dominica* tiene una distribución cosmopolita y está bien establecida en las regiones templadas del mundo (Potter, 1935; Dell'Orto 1985; Fields *et al.*, 1993); se atribuye el status de cosmopolita debido a la habilidad que tiene de volar, de colonizar nuevos almacenamientos de granos y su resistencia a insecticidas (Guedes, 1990; Price, 1984). Winterbottom (1922) colectó insectos a 5 Km de distancia de una infestación fuerte (Fields *et al.*, 1993). No tiene una distribución exacta, los factores naturales dejaron de ser una barrera, ya que su distribución depende de la distribución de los granos (Guedes, 1990; Potter, 1935; Downy, 1994).

Biología. Las hembras depositan de 300 a 400 huevecillos en la superficie de los granos o entre ellos. Al emerger las larvas, que tienen patas, se abren camino hacia el interior de los granos de los cuales se alimentan y generalmente pasan la fase de pupa dentro de los granos; el estadio pupal es de 3 a 6 días, dependiendo de las condiciones ambientales, y cuando estas son adversas pueden tardar hasta 20 días (Ramírez, 1980; Davidson, 1992). El tiempo promedio desde huevo hasta la emergencia es de 45 días a 27°C (Hangstrum y Flinn, 1994). Las condiciones óptimas para su desarrollo son de 32 a 38°C y 60 a 80% de humedad relativa, sin embargo, puede sobrevivir en condiciones más calientes y secas (Rees, 1996). El adulto tiene una longevidad de 4 a 6 meses.

Importancia. El barrenador menor de los granos, *R. dominica* es una importante plaga de cereales almacenados a nivel global (Guedes, 1997). Presumiblemente es la plaga de insectos de granos de almacén más importante a nivel mundial (Longstaff, 1999). El hecho de ser la principal plaga del trigo almacenado y su proliferación se debe en parte a que la

mayoría de los embarques de trigo que se importan están infestados por este insecto. El trigo importado contiene menos del 12% de humedad, porcentaje adecuado para *Rhizopertha dominica*, que prolifera perfectamente en granos secos. El control de *R. dominica* es complicado debido a su alta tolerancia al calor (Evans y Dermott, 1981) y su bien demostrada resistencia a la fosfina (Price, 1984).

Amilasas

El almidón sirve como alimento de reserva para las plantas, es la más importante reserva de carbohidratos de las plantas superiores. En algunos casos llega a alcanzar el 70% de la materia seca de la planta (Prasanna, 2007). Para utilizarlo, los organismos pueden tener enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos (1-4) entre los residuos α -D-glucopiranosos. Las enzimas capaces de hidrolizar al almidón son llamadas amilasas y son ampliamente producidas por plantas, bacterias y animales (Prasanna, 2005). Inicialmente el término amilasa se usó para designar a las enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos α -1,4- de la amilosa, amilopectina, glucógeno y los productos de su degradación (Bernfeld, 1955; Fisher y Stein, 1960; Myrback y Neumuller, 1950).

Clasificación de enzimas amilásicas

Las amilasas han sido clasificadas por diferentes criterios: a) por la configuración del átomo de carbono anomérico de sus productos, b) por la fuente biológica de donde proceden, c) por el tipo de ataque que efectúan, d) por la rápida caída de viscosidad del

sustrato (licuefacción), e) por una disminución de caída (sacarificación), por el tipo de producto(s) producido(s), y f) por la naturaleza de su estructura proteica.

La clasificación más antigua y más común en la designación α o β está basada en la configuración anomérica del orden de sus productos; las α -amilasas liberan productos con la configuración α -D- y la β -amilasa libera productos con la configuración β -D-. Las amilasas están divididas como endo-amilasas (α -amilasas, EC 3.2.1.1.) y exo-amilasas (β -amilasa, EC 3.2.1.2. y γ -amilasas, EC 3.2.1.3.) (Tsao *et al.*, 2004).

En 1955, la Asamblea General de la Unión Internacional de Bioquímica (actualmente IUBMB), durante su tercer congreso internacional en Bruselas, acordó crear una Comisión Internacional de Enzima, bajo la consulta de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC); dicha comisión (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature “CBN”) trabajó arduamente para conseguir un listado sistemático de enzimas; en 1977 se discontinuó el comité para crear 2 comités formales: La IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) y el “Nomenclature Committee of IUBMB” (NC-IUBMB) (IUBME, 2007). En la práctica ambos comités trabajan juntos.

En 1992 se publicó la sexta edición completa de “Nomenclatura de Enzimas”, la más actual hasta el día de hoy (pero con adiciones anuales al listado); en la cual encontramos clasificadas a las α -amilasas con el número EC.3.2.1.1; perteneciente a los clase de hidrolasas (EC. 3), subclase glucosilasas (EC. 3.2) y al grupo de las glucosidasas (EC. 3.2.1), que son las enzimas que hidrolizan a los compuestos O- y S-glucosílicos (IUBMB, 2006). Las α -amilasa son aquellas enzimas que participan en las reacciones de endohidrólisis de los enlaces 1,4- α -D-glucosídicos en polisacáridos que contengan 3 ó más

unidades de 1,4- α -D-glucosa. Esta misma comisión le asigna el nombre sistémico de 1,4- α -D-glucan glucanohidrolasa, y la reconoce bajo otros nombres comunes como: gluconasa, α amilasa, alpha amilasa, endoamilasa, Taka-amilasa A. Son enzimas que actúan sobre el almidón, glucógeno, oligo y polisacáridos similares de manera aleatoria reduciendo grupos que son liberados con una configuración α . El término α se relaciona con la configuración anomérica inicial del azúcar liberado y no la de la configuración del enlace hidrolizado.

En general las α -amilasas son endoglucosidasas, atacando glucanos en alguna parte fuera de las cadenas finales de un enlace glucosídico y produciendo una caída rápida en la viscosidad del sustrato. Las β -amilasas atacan glucanos de una manera exo en los extremos no reducidos para producir un tipo simple de producto de bajo peso molecular con una configuración β (Whistler *et al.*, 1984).

Las enzimas tienen múltiples formas, y esto se refiere a todas las proteínas que catalizan la misma reacción y que se encuentra en una sola especie. Market y Moller (1959) propusieron el término *isozimas* para describir a estas proteínas con variaciones moleculares. Este término se alterna comúnmente con el de *isoenzimas*, usados para describir proteínas con distintas formas moleculares sin indicar el origen de estas formas o las diferencias moleculares entre ellos. Sin embargo, estrictamente hablando, *isoenzimas* son aquellas enzimas pertenecientes a un grupo de enzimas que catalizan la misma reacción, pero que tienen distintas estructuras moleculares, caracterización física, propiedades bioquímicas e inmunológicas (IUPAC, 1997).

Digestión del almidón

En el metabolismo de las plantas y animales, se emplean los mismos mecanismos enzimáticos para movilizar los hidratos de carbono almacenados. En los animales, la digestión del almidón y el glucógeno empieza en la boca, con la acción de la α -amilasa que se secreta en la saliva. Esta enzima rompe los enlaces internos $\alpha(1-4)$ de ambos polímeros. En el intestino, la digestión continúa, facilitada por la α -amilasa secretada por el páncreas. Esta enzima degrada la amilasa a maltosa y un poco de glucosa. Sin embargo, sólo degrada parcialmente la amilopectina y el glucógeno, como se observa en la Fig. 3, porque no es capaz de romper los enlaces $\alpha(1-6)$ que se encuentran en los puntos de ramificación. El producto de la digestión exhaustiva de la amilopectina o del glucógeno por la α -amilasa se denomina dextrina limitante; para continuar con su degradación es necesaria la acción de una enzima desramificante, la $\alpha(1-6)$ -glucosidasa, o también llamada isomaltasa). Esta acción expone un grupo nuevo de ramificaciones con enlaces $\alpha(1-4)$, que pueden ser atacadas por la α -amilasa, hasta alcanzar una nueva serie de ramificaciones con enlaces $\alpha(1-6)$. El resultado final de la acción secuencial de estas dos enzimas es la degradación completa del almidón o del glucógeno a maltosa y algo de glucosa. La maltosa se rompe hidrolíticamente por la maltasa, dando 2 moles de glucosa, que se absorbe a continuación al torrente sanguíneo y se transporta a los diversos tejidos para su utilización (Mathews, 2004).

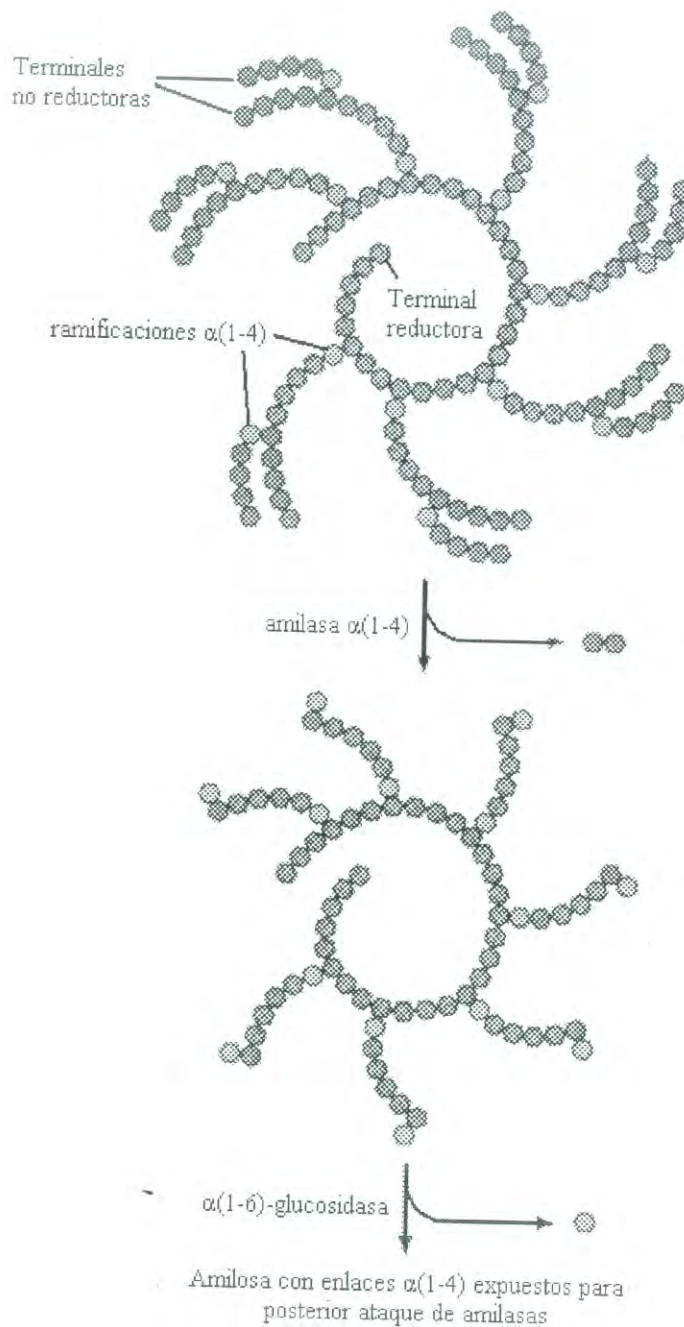


Fig. 3. Digestión secuencial de la amilopectina por acción de la α -amilasa y la $\alpha(1-6)$ -glucosidasa. La α -amilasa rompe los enlaces 1-4 entre las unidades de maltosa de la amilopectina (arriba). Sin embargo no rompe los enlaces glucosídicos 1-6 en el polímero ramificado, y se acumula una dextrina limitante (en gris), salvo que haya $\alpha(1-6)$ -glucosidasa. (abajo) La $\alpha(1-6)$ -glucosidasa rompe los puntos de ramificación, y expone el núcleo de amilasa a la posterior digestión efectuada por la amilasa.

Fuente: Mathews, 2004.

Aplicación de enzimas α -amilásicas en la industria

Las amilasas tienen una gran importancia dentro de las aplicaciones biotecnológicas en panificación, alimentos, textiles e industria papelera (Pandey *et al.*, 2000). Las amilasas tienen aproximadamente el 25% del mercado de enzimas (Burhan *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 1998; Sidhu *et al.*, 1997); han remplazado, casi en su totalidad, al proceso químico de hidrólisis del almidón a nivel industrial (Pandey, 2000).

Las α -amilasas (α -1,4-glucan glucano hidrolasa, EC 3.2.1.1) catalizan la endohidrólisis de los enlaces α -1,4- glucosídicos del almidón y otros oligosacáridos menores semejantes. Cada aplicación que requiera el empleo de enzimas α -amilásicas, tendrá requerimientos únicos con respecto a propiedades de estabilidad, especificidad, temperatura y dependencia del pH (Mc Tighe *et al.*, 1995). Las α -amilasas termoestables tienen muchas aplicaciones comerciales en la industria de almidones, cervecería, producción de azúcares (Leveque *et al.*, 2000), industria textil (Hendriksen *et al.*, 1999) y en proceso de manufactura de detergentes (Hewitt y Solomons, 1996, Lin *et al.*, 1998). La termoestabilidad es una característica deseable en la mayor parte de la industria de las enzimas (Asgher, 2005).

Purificación de enzimas

El primer paso de una serie de estudios dirigidos a explorar la función de una proteína es la purificación de la proteína de interés. Con anticipación se debe considerar la estabilidad de la enzima, el pH y la temperatura relativa de trabajo (Kruger, 1986). Las proteínas se pueden separar entre sí en base a su solubilidad, tamaño, carga y capacidad de

unión. Cuando se purifica una proteína, se puede determinar su secuencia de aminoácidos y su función bioquímica (Stryer, 2003).

Para poder reconocer a la proteína que buscamos, el bioquímico necesita una prueba, conocida como ensayo, que identifique alguna propiedad especial de esa proteína. Encontrar un ensayo eficaz a menudo es difícil.

Para tener más claro nuestro esquema de purificación necesitamos un elemento adicional de información: la cantidad de proteína presente en la mezcla que se ensaya. Hay varios métodos rápidos y precisos para medir la concentración proteica. Con estos dos valores determinados experimentalmente –actividad enzimática y concentración de proteína- podemos calcular la actividad específica, que es la relación entre la actividad enzimática y la cantidad de proteína en el ensayo enzimático. La actividad específica crecerá conforme se produzca la purificación y la mezcla proteica esté formada por mayor cantidad de la enzima deseada (Stryer, 2003). Esencialmente, para conseguir la purificación hace falta alcanzar un valor máximo en la actividad específica.

Una vez elegido el ensayo y el método de determinación de proteína, debemos fraccionar a la célula en sus componentes. El ensayo de fraccionamiento se desarrolla por el método de ensayo-error, basándose en experiencias anteriores. En un primer paso, se forma un homogenizado por ruptura de las membranas celulares; se fracciona la célula por centrifugación, que da lugar a un precipitado de material pesado en el fondo del tubo de centrífuga y un sobrenadante más ligero encima. El sobrenadante se centrifuga de nuevo con una fuerza centrífuga mayor obteniéndose un nuevo precipitado y otro sobrenadante. El proceso se llama centrifugación diferencial, produce fracciones de densidad decreciente, cada una de ellas con varios cientos de proteínas distintas, que se ensayan posteriormente

para obtener la actividad que se purifica. Normalmente se encuentra una fracción enriquecida en actividad, y será la fuente de material en la que se aplicarán técnicas de purificación más discriminatorias.

Se han purificado varios miles de proteínas en forma activa en base a características como solubilidad, tamaño, carga y afinidad específica de unión. El mecanismo habitual consiste en que la mezcla de proteínas se somete a diferentes separaciones cada una de ellas basada en propiedades diferentes, para obtener la proteína pura. En cada paso de la purificación se ensaya la actividad de la proteína deseada y se determina la concentración proteica. Se necesitan cantidades importantes de proteínas puras, del orden de miligramos, para esclarecer sus estructuras tridimensionales y sus mecanismos de acción. Por lo tanto, el rendimiento global es un rasgo importante en el esquema de purificación. Se pueden utilizar diversas técnicas de purificación (Stryer, 2003).

Precipitación salina

La mayoría de las proteínas son menos solubles a concentraciones elevadas de sal, un efecto llamado precipitación salina. Las concentraciones de sal en las que precipita una proteína varían de una proteína a otra; de aquí que la precipitación salina pueda utilizarse para fraccionar proteínas. Así, por ejemplo, el sulfato de amonio 0.8 M precipita al fibrinógeno, una proteína de la coagulación sanguínea, mientras que se necesita una concentración de 2.4 M para precipitar la albúmina del suero. Además, la precipitación salina es útil para concentrar disoluciones diluidas de proteínas, incluyendo las fracciones activas obtenidas en otros pasos de la purificación. Para eliminar la sal, cuando sea necesario, se puede utilizar la diálisis (Stryer, 2003)..

Diálisis

Las proteínas se pueden separar de moléculas pequeñas mediante la diálisis a través de una membrana semipermeable, como puede serlo una membrana porosa de celulosa. Las moléculas con dimensiones significativamente mayores que el diámetro del poro se retienen dentro de la bolsa de diálisis, mientras que las moléculas más pequeñas y los iones atraviesan los poros de esta membrana y aparecen en el dializado fuera de la bolsa. Esta técnica es útil para retirar la sal u otras moléculas pequeñas, pero no discriminará de forma efectiva las proteínas entre sí (Lehninger, 1985).

Cromatografía de filtración en gel

Se pueden conseguir separaciones más discriminatorias, basadas en el tamaño, por medio de la técnica de cromatografía de filtración en gel. La muestra se coloca en lo alto de una columna rellena de esferas porosas compuestas de un polímero insoluble, pero altamente hidratado, tales como el dextrano o la agarosa (carbohidratos) o la poliacrilamida. Sephadex, Sepharosa y Biogel son preparaciones comerciales de estas esferas usadas normalmente, que tienen un tamaño de unos 100 μm (0.1 mm) de diámetro. Las moléculas pequeñas pueden entrar en estas esferas, pero no las grandes. El resultado es que las moléculas pequeñas se distribuyen tanto en el interior de las esferas como entre ellas, mientras que las moléculas grandes se localizan solamente en la disolución entre las esferas. Las moléculas grandes fluyen más rápidamente a través de esta columna y salen antes porque disponen de un volumen accesible menor. Las moléculas que son de un tamaño intermedio y que pueden penetrar en las esferas solo parcialmente fluirán de la

columna en una posición intermedia y las moléculas pequeñas, que siguen un camino más largo y sinuoso, saldrán últimas (Lehninger, 1985).

Cromatografía de interacción hidrofóbica

La técnica de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) es una técnica útil para la purificación y la separación de biomoléculas basándose en diferencias en la hidrofobicidad superficial. Las técnicas de cromatografía de interacción hidrofóbicas se han utilizado como parte de estrategias de purificación de proteínas, conjuntamente con otras técnicas cromatográficas tales como cromatografía de la filtración en gel y de intercambio iónico. Muchas biomoléculas, consideradas generalmente hidrofílicas, también tienen suficientes números de grupos hidrofóbicos permitiendo la interacción con los ligandos hidrofóbicos uniéndose a la matriz cromatográfica. Esta característica permite el uso de condiciones suaves de elución que nos permite mantener la actividad biológica de la muestra. La HIC es una alternativa para explotar las propiedades hidrofóbicas de las proteínas, trabajando en un ambiente más polar y menos desnaturizante. Srinivasan y Ruckenstein (1980) propusieron que la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) se debe a las fuerzas de atracción de van der Waals entre las proteínas y los ligandos inmovilizados. La base de esta teoría es que las fuerzas de van der Waals entre la proteína y el ligante se incrementan conforme la estructura ordenada del agua disminuye por el efecto salino.

La adsorción se lleva a cabo en presencia de altas concentraciones salinas, y la desorción a bajas concentraciones (Stuart, 2003). El grado de sustitución del ligante para HIC es usualmente entre 10-50 $\mu\text{moles/mL}$ de ligantes alquilos o arilos.

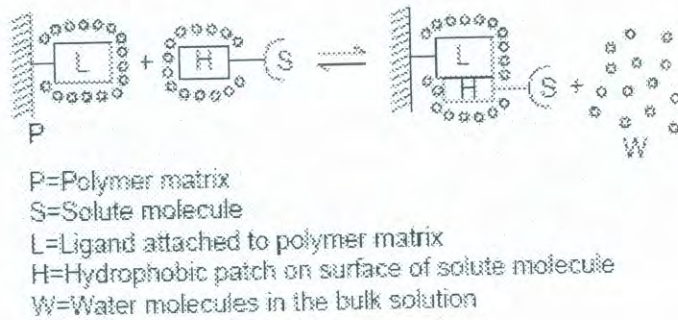


Fig. 4. Fundamento de la cromatografía de interacción hidrofóbica. Cerca de la superficie del ligante y del soluto hidrofóbico (enzima), el agua se encuentra más ordenada que en el resto de la solución y parece “blindar” al ligante y al soluto. Adicionando sal esta interacciona fuertemente con las moléculas de agua y deja menos moléculas disponibles para el “efecto de blindaje”, lo que favorece a la interacción entre la matriz y la proteína.
 Fuente: Stuart, 1993.

La fenil sefarosa CL-4B (Sigma, tamaño de particular 45-165 μm), es un medio de separación para cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). Las sustancias se separan en base a su diferencia de hidrofobicidad. El grupo fenilo está unido a una matriz de agarosa, mediante enlaces éster formando un gel hidrofóbico con propiedades no iónicas (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2002).

La fenil sefarosa CL-4B de Sigma-Aldrich P-7892, viene en forma de suspensión en etanol al 20%. El etanol reduce marcadamente la interacción hidrofóbica, por lo que es esencial lavar y remover las trazas del alcohol; esto se consigue lavando el gel con al menos 10 volúmenes de agua deionizada y decantando el sobrenadante; posteriormente se prepara la suspensión con el buffer de equilibrio. Se procede a empacar y equilibrar la columna dentro del cuarto frío a la misma temperatura en la cual se desarrollará la cromatografía. Al empacar hay que estar seguro de no queden atrapadas burbujas de aire, para lo cual el gel debe de irse adicionando de forma constante por las paredes. Una vez empacado, se debe equilibrar con al menos 2 volúmenes de buffer de equilibrio (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2002). Todas las soluciones y muestras empleadas en el proceso de cromatografía deben de estar filtradas a través de filtro de nylon Whatman de tamaño de poro 0.45 μm .

Posterior a la elución de la muestra se debe de regenerar la resina, lo cual se puede hacer con lavados de 2-3 volúmenes con una solución al 30% de isopropanol y 3 volúmenes de agua destilada, seguido de un reequilibrio de la columna con buffer de ensayo. Para garantizar la regeneración y remover algunos pigmentos fuertemente adheridos, se puede emplear secuencialmente etanol al 70%, isopropanol y urea 6 M, con su posterior lavado con agua deionizada y reequilibrio con el buffer (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2002).

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las separaciones electroforéticas se realizan casi siempre sobre geles (o sobre soportes sólidos como el papel) porque el gel sirve como tamiz molecular que potencia la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros del gel se desplazan fácilmente a través, mientras que las moléculas más grandes que los poros permanecen casi inmóviles. Las moléculas de tamaño intermedio se desplazan a través del gel con diversos grados de dificultad. La electroforesis se lleva a cabo en un bloque delgado, vertical, de poliacrilamida. La dirección del flujo es vertical descendente. Los geles de poliacrilamida, formados por la polimerización de la acrilamida entrecruzada por metilbisacrilamida, son los soportes preferidos para la electroforesis porque son inertes químicamente y se forman con facilidad. La electroforesis se diferencia de la filtración en gel en que todas las moléculas están impedidas a moverse a través de la misma matriz. El gel se comporta como una de las esferas de la columna de filtración en gel (Stryer, 2003).

La electroforesis sobre gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), es rápida, sensible y capaz de un alto grado de resolución. Cuando se tiñe con azul de Coomassie, basta 0.1 μg ($\sim 2\text{pmol}$) de una proteína para dar una banda diferenciada y, con la tinción de plata se pueden detectar cantidades aun menores ($\sim 0.02\ \mu\text{g}$). Se puede distinguir, normalmente, entre proteínas que difieren entre sí aproximadamente en un 2% de sus masas (por ejemplo, entre 40 y 41 kD, lo que corresponde a una diferencia de unos 10 residuos de aminoácidos).

La eficacia de un protocolo de purificación es comúnmente llevada a cabo analizando una parte de cada fracción proteica por SDS-PAGE. Las fracciones iniciales mostrarán desde docenas hasta centenares de proteínas. Conforme progresa la purificación,

el número de bandas disminuirá y la prominencia de una de las bandas deberá aumentar. Esta banda corresponde a la proteína de interés.

Conceptos del protocolo de purificación.

Para determinar el éxito de un protocolo de purificación de proteínas, se deben utilizar los siguientes conceptos (Stryer, 2003):

Proteína total. La cantidad de proteína presente en una fracción se obtiene determinando la concentración de proteína en una alícuota de cada fracción y multiplicándola por el volumen total de la fracción.

Actividad total. La actividad enzimática de la fracción se obtiene midiendo la actividad enzimática en una alícuota de cada fracción y multiplicándola por el volumen total de cada fracción.

Actividad específica. Este parámetro se obtiene dividiendo la actividad total por la proteína total.

Rendimiento. Este parámetro es una medida de la actividad existente después de cada paso de purificación expresada como porcentaje de la actividad del extracto crudo. La actividad del extracto inicial se toma como el 100%.

Grado de purificación. Este parámetro mide el incremento de impurezas y se obtiene dividiendo la actividad específica, calculada después de cada paso de purificación, por la actividad específica del extracto inicial.

Un buen esquema de purificación tiene en cuenta tanto los niveles de purificación como el rendimiento. Un alto grado de purificación y un bajo rendimiento proporcionan poca proteína con la que experimentar. Un alto rendimiento con baja purificación deja

muchos contaminantes (proteínas diferentes de la de interés) en la fracción y complica la interpretación de los experimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de la Actividad Enzimática

Esta etapa experimental consiste en el aislamiento y purificación parcial de las isoamilasas de insectos adultos de *Rhyzopertha dominica* Fab. mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de interacción hidrofóbica utilizando fenil sefarosa CL-4B.

Cultivos de insectos

Se emplearon 3 poblaciones de insectos cultivadas bajo condiciones controladas. 100 insectos adultos no sexados fueron colocados en frascos de vidrio conteniendo 1 Kg de trigo tetraploide variedad Júpare. Los frascos infestados se mantuvieron por 45 días a 65-70% HR y 30°C hasta la emergencia de nuevos adultos (Baker, 1991). La progenie se recolectó a los 7 días de la emergencia y fueron empleados para la preparación de los extractos amilolíticos crudos de *Rhyzopertha dominica*.

Obtención de extractos enzimáticos de *Rhyzopertha dominica*

Para la obtención de los extractos amilolíticos se utilizó la técnica descrita por Baker (1991). Los insectos adultos de *R. dominica* fueron tamizados a través de mallas U.S. Standard No. 10, 16 y 50, para separar los insectos de granos de trigo y eliminar pequeñas partículas de salvado y harina generado por el desarrollo de los mismos. Los insectos fueron macerados manualmente en un mortero en una solución buffer de ensayo compuesto

por Tris-HCl 20 mM, pH 7, conteniendo NaCl 20 mM y CaCl₂ 0.1 mM (Baker y Woo, 1985; Baker, 1991) en una proporción de 3 mL/g de insecto. Los extractos fueron centrifugados por 30 min a 6000 g para la eliminación de partículas no solubles y posteriormente se filtraron a través de un filtro de lana de vidrio para eliminar, tanto como fue posible, lípidos y mucílago flotante.

Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

Los extractos enzimáticos obtenidos fueron tratados con sulfato de amonio a 4°C. Se emplearon grados de saturación del 0-25, 25-50, 50-75% con sulfato de amonio (Dawson, 1969). La fracción del extracto crudo tratado con sulfato de amonio a un 25% de saturación fue centrifugada a 14,000 g a 4°C por 60 min. El residuo obtenido fue resuspendido en 10 mL de buffer de ensayo (20 mM Tris-HCl, pH 7, conteniendo 20 mM de NaCl y 0.1 mM de CaCl₂). El sobrenadante fue recuperado y la concentración de sulfato de amonio se ajustó hasta 50%. Después de dejar reposar por 1 h a 4°C, la mezcla se centrifugó y se trató de igual forma como en el paso inicial de precipitación. Al sobrenadante se le ajustó la concentración de sulfato de amonio hasta 75% y el precipitado fue recuperado y rediseuelto en buffer de ensayo. A cada una de las fracciones proteicas obtenidas se les determinó su concentración de proteína y actividad amilolítica. Las fracciones con la más alta actividad amilolítica (25-50 y 50-75%) fueron combinadas y utilizadas en las subsecuentes etapas de purificación.

Cromatografía de interacción hidrofóbica

La fracción proteica precipitada con sulfato de amonio entre 25 y 75% de saturación fue empleada para su análisis en una cromatografía de interacción hidrofóbica en fenil sefarosa CL-4B (Sigma-Aldrich P-7892; densidad del ligante 40 μ moles/mL, tamaño de partícula 45-165 μ m) utilizándose una columna de 1 x 50 cm. La columna fue inicialmente equilibrada con buffer de equilibrio (buffer de ensayo conteniendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 25% de saturación). Un volumen de 5 mL (aproximadamente 20 mg de proteína) fue aplicado a la columna (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2002). La elución de las proteínas que no se unieron a la fenil sefarosa se realizó mediante la aplicación constante de buffer de equilibrio hasta que no se detectó proteína a 280 nm. El flujo de elución fue de 18 mL/h. Fracciones de 3 mL fueron colectadas empleando un colector de fracciones automático. La detección de proteína se realizó leyendo su absorbancia a 280 nm.

La proteína unida a la columna fue eluida mediante un gradiente lineal negativo de sulfato de amonio de 25 a 0% en buffer de ensayo y un gradiente lineal positivo de etilén glicol desde 0 a 50% (v/v) en el mismo buffer, pero sin sulfato de amonio. Volúmenes de 100 μ L de cada fracción colectada fueron analizados en actividad amilolítica usando almidón soluble como sustrato (Frels y Rupnow, 1984). Las fracciones colectadas fueron analizadas en electroforesis no disociante tanto para detectar bandas de actividad y bandas de proteína mediante tinción con nitrato de plata (Merril *et al*, 1981).

Diálisis

Con el objeto de remover el etilén glicol, los distintos picos de actividad amilolítica obtenidos de la columna de fenil sefarosa fueron dializados contra buffer de ensayo empleando una membrana de diálisis de 12,000 Daltones de corte molecular. La diálisis se realizó durante 12 h, con 2 recambios de buffer de ensayo en un cuarto frío a 4°C.

Determinación de actividad amilolítica

La actividad amilolítica de los extractos crudos, fracciones cromatográficas y ensayos enzimáticos fueron determinadas mediante la técnica de Bernfeld (1955), el cual cuantifica la producción de azúcares reductores valorada como equivalentes de maltosa (Frels y Rupnow, 1984).

El sustrato para los extractos crudos y fracciones cromatográficas fue almidón de papa (Sigma S2330; St. Louis, MO) y para las determinaciones de parámetros enzimáticos se empleó almidón de trigo de la variedad de trigo tetraploide Rayón purificado en el laboratorio. Ambos tipos de almidón fueron tratados previamente con borohidruro de sodio para eliminar grupos reductores (Strumeyer, 1972). En tubos de ensayo de 18 X 150 mm, se tomaron alícuotas (20-150 μ L) de los extractos enzimáticos y se combinaron con 375 μ L de la solución del almidón preparado, en un volumen final de 1 mL, ajustado con buffer de ensayo (Tris-HCl 20 mM, conteniendo NaCl 20 mM y CaCl₂ 0.1 mM). La temperatura de reacción fue de 28°C y el tiempo de reacción fue de 10 min, al final de los cuales se adicionó 1 mL de la solución de agente de color (ácido dinitrosalicílico al 1%, conteniendo tartrato de sodio y potasio al 30% en NaOH 0.5M). Los tubos fueron colocados en un baño de agua a temperatura de ebullición por un periodo de 10 min para el desarrollo de color.

La absorbancia fue leída a 546 nm (Bernfeld, 1955) en un espectrofotómetro UV/Vis Shimadzu UV-12015, en celdas de cuarzo de paso de luz de 1 cm (Thomas Spectrometer cell, 6Q).

Para la cuantificación de azúcares reductores como equivalentes de maltosa, se empleó una curva estándar de maltosa utilizando una solución 10 mM de maltosa monohidratada. La selección de la alícuota de los extractos enzimáticos fue en base en la pérdida de la linealidad de la curva (Frels y Rupnow, 1984). Una unidad de actividad enzimática (UA) se definió como la cantidad de proteína en la solución enzimática que produce 1 μ M de maltosa/min bajo las condiciones de ensayo. Los ensayos fueron realizados por duplicado y al menos con 2 repeticiones.

Determinación de proteína

La cuantificación de proteína en los extractos enzimáticos de *R. dominica* y fracciones cromatográficas se determinó de acuerdo al método de Bradford (1972) el cual se basa en un cambio en el espectro de color del colorante azul de Coomassie G-250 al unirse a las proteínas. Este colorante se une vía interacción electrostática a residuos de arginina, histidina, lisina, tirosina, triptófano y fenilalanina. Este método tiene una sensibilidad hasta de 1 μ g de proteína y presenta una baja interferencia ante la presencia de agentes químicos. El procedimiento de determinación de proteína consistió en combinar alícuotas de 50 μ L de solución proteica con 1 mL de reactivo comercial de Bradford. Se dejó reposar por 15 min antes de tomar la lectura de absorbancia a 650 nm. Se utilizó albúmina de suero bovino como estándar.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

La actividad amilolítica de los extractos crudos y fracciones cromatográficas fue evaluada electroforéticamente en geles de 10% de acrilamida en el gel de separación y 4% de acrilamida en el gel de compactación (Laemmli, 1972). La separación se realizó empleando un equipo electroforético Mini-Protean II cell (Bio-Rad, Richmond, CA) y una fuente de energía Bio-Rad Power Pac 1000. La separación de proteínas se llevó a cabo a 200 volts y corriente variable por aproximadamente 45 min.

Electroforesis disociante. Se empleó la técnica de electroforesis bajo condiciones disociantes (Laemmli, 1972) empleando geles de poliacrilamida al 10% conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%. Alícuotas de 20 ó 25 μ L de muestras amilolíticas de extractos crudos y de los picos con actividad amilolítica obtenidas de la cromatografía de fenil sefarosa fueron analizadas electroforéticamente por zimografía. Los extractos enzimáticos fueron separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones disociantes o no disociantes, según el objetivo del ensayo, bajo las condiciones generales descritas anteriormente. Una vez que el indicador azul de bromofenol llega a 3 mm del borde inferior del gel, se detuvo la separación. El gel se sumergió en una solución al 1% de almidón soluble (preparado en buffer de ensayo) por 30 min a 28°C. Después de lavar el gel con buffer de ensayo para eliminar almidón residual, se agregó 50 ml de una solución de iodo 0.01 M conteniendo KI 0.014 M. El almidón no degradado en el gel se tiñó de color azul oscuro, mientras que la presencia de amilasas se manifestó por la presencia de bandas amarillo claro. Al gel se le tomó una fotografía inmediatamente dado que este tipo de tinción no es permanente.

Detección de proteína por tinción de plata. Al gel que se obtiene de la electroforesis se le realizó una tinción con nitrato de plata. Es una alternativa a la tinción rutinaria de geles de proteínas por su facilidad de uso y su gran sensibilidad (entre 100 y 1000 veces más sensible que la tinción con Azul de Coomasie) (Reina, 2003). El límite de detección es de 1-10 ng/banda proteína. Este método requiere trabajar con agua y reactivos de alta pureza para evitar que el gel adquiriera un tono pardo. Todos los métodos de tinción con plata conllevan la reducción de iones plata a su forma metálica, pero no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual se tiñen las proteínas con la plata. Tras fijarse el gel en ácido acético/etanol se tiñe con una solución 0,1% de nitrato de plata. El gel se conserva indefinidamente tras ser secado.

Caracterización enzimática

La caracterización enzimática es el medio mediante el cual se puede conocer la actividad biológica de la enzima de estudio. Se hace uso de la interacción de la enzima con otras moléculas o bajo distintas condiciones para conocer la influencia que ejercen sobre el objeto de estudio (Bell, 1988). Todos los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo a 28°C en un baño de agua (GCA/Precision, Mod. 188, Chicago, Illinois.). El buffer de ensayo empleado es buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7, conteniendo NaCl 20 mM y CaCl₂ 0.1 mM. Los ensayos enzimáticos se realizaron con las fracciones obtenidas de la cromatografía de interacción hidrofóbica (picos con actividad amilásica 1, 2 y 3) y el extracto crudo de *Rhizopertha dominica*.

Determinación del pH óptimo

Para conocer el pH óptimo de actividad de los extractos amilolíticos se llevó el ensayo enzimático a distintos valores de pH empleando para ello diferentes buffers en una concentración 20 mM y conteniendo NaCl 20 mM y CaCl₂ 0.1 mM: Acetato de sodio a pH 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5; buffer de fosfato de sodio monobásico a pH 6.0, 6.5 y 7.0; y buffer Tris-HCl a pH 7.5 y 8.0 (Stauffer, 1989). Los ensayos se realizaron por duplicados y 2 réplicas.

Efecto de la temperatura en la actividad amilásica

Se determinó la influencia del calor sobre la actividad amilolítica a diferentes intervalos de tiempo. Se emplearon temperaturas de 50° y 60°C. Alícuotas (20-100µL) de IA obtenidas de la columna de fenil sefarosa fueron colocadas en tubos de ensayo de 18 X 150 colocados en un baño de agua a la temperatura deseada. A intervalos de tiempo de 10 min, los tubos fueron rápidamente retirados del baño de agua y colocados en un baño de agua-hielo para detener el efecto del calor (Stauffer, 1989). La actividad enzimática residual fue determinada agregando almidón como sustrato y deteniendo la reacción con ácido dinitrosalicílico al 1% preparado como se describió anteriormente. La actividad fue expresada como porcentaje de actividad residual en base a la actividad inicial sin tratamiento térmico.

Efecto del mercaptoetanol sobre la actividad amilásica

En ensayos preliminares se observó que el mercaptoetanol incrementaba la actividad amilolítica de las isoenzimas de *Rhyzopertha dominica*, por lo que se diseñó un ensayo para determinar la concentración óptima a la cual las isoamilasas presentan mayor

actividad enzimática. El β -mercaptoetanol (BME) es un agente reductor capaz de reducir los enlaces disulfuro de las proteínas (-S-S-) a grupos sulfhidrilo (-SH). Los enlaces disulfuro pueden ser intra- o intermoleculares, de tal forma que su ruptura desnaturaliza la estructura molecular logrando a separar las subunidades de una proteína multimérica.

Para realizar este ensayo, concentraciones de β -mercaptoetanol en un rango de 10 a 50 mM se prepararon en buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7, conteniendo NaCl 20 mM y CaCl_2 0.1 mM. Alícuotas de 20 ó 25 μl de las isoamilasas obtenidas de la cromatografía de interacción hidrofóbica se pre-incubaron por 5 min con las distintas concentraciones de β -ME en un volumen final de 675 μl antes de agregar 375 μl de una solución de almidón al 2% (p/v). La reacción de hidrólisis se llevó a cabo exactamente por 10 min y se detuvo agregando 1 ml de ácido dinitrosalicílico al 1%. La actividad amilolítica se determinó de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente con dos réplicas y duplicados de los ensayos.

Determinación de parámetros cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos V_{max} y K_m se llevó a cabo empleando distintas concentraciones de almidón, amilasa o amilopectina para cada una de las isoamilasas obtenidas de la cromatografía de interacción hidrofóbica. Mediante este ensayo se determinaron experimentalmente los parámetros cinéticos de velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis-Menten (K_m) (Baker y Woo, 1985). Mediante este ensayo se determina la velocidad máxima de reacción enzimática, que es cuando el sitio o

sitios activos de la enzima están saturados con sustrato, mientras que K_m refleja la afinidad de la enzima por el sustrato.

Alíquotas de enzimas purificadas (20-100 μL) de la cromatografía de fenil sefarosa fueron colocadas en tubos de ensayo de 18 x 150 y combinadas con volúmenes de soluciones de sustrato (almidón, amilasa o amilopectina) equivalentes a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 mg. La reacción se llevó a cabo por 10 min y se detuvo al añadir 1 mL de ácido dinitrosalicílico al 1%. Los tubos se colocaron en un baño de agua a ebullición para el desarrollo de color y se les agregó a cada uno de ellos 2.5 mL de agua destilada. La absorbancia fue leída en un espectrofotómetro a 546 nm. Se realizan duplicados y dos réplicas.

Determinación de amilosa residual

La amilosa, al igual que la amilopectina, forma un complejo de color azul con yodo cuya intensidad es proporcional a la concentración de amilosa presente en solución (Knutson, 1986). Cuando la amilosa es hidrolizada por la acción de las amilasas, su capacidad para unir yodo es disminuida a medida de que las cadenas de amilosa son reducidas en tamaño. La velocidad de pérdida del color azul es útil para comparar la acción de distintas amilasas sobre la amilosa. En tubos 150 x 10 mm, se colocaron 250 μL del sustrato (amilosa, amilopectina o almidón de trigo variedad Rayón al 2%, reducido con borohidruro), y la cantidad de enzima y buffer necesarios en un volumen total de 1 mL (cantidad que produzca equivalentes de maltosa que puedan ser leídos en la curva estándar de maltosa). La reacción se dejó transcurrir por 5, 10, 20, 40 y 60 min. Exactamente al final de cada tiempo de hidrólisis, una alícuota de 100 μl de la mezcla de reacción fue retirada y

se colocó en un tubo sumergido en un baño de agua a ebullición con el fin de detener la acción amilolítica. Después de 3 min cada tubo se les agregó 900 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) conteniendo iodo 6.17×10^{-3} M. Los tubos se dejaron reposar por 16 h en la oscuridad y se les agregó 8 mL de agua destilada y se dejaron reposar por 30 min. La formación del color azul se leyó a 600 nm en un espectrofotómetro UV/Vis. Se preparó un blanco con 900 μL de DMSO y 8.1 mL de agua destilada. Los valores fueron reportados como porcentaje de pérdida de absorción de iodo.

Producción de azúcares reductores

Se basa en la cuantificación de azúcares reductores, expresados como equivalentes de maltosa, y se determina del mismo modo que en los ensayos de determinación de actividad amilolítica y cinética enzimática (Bernfeld, 1955). Alícuotas de 1 mL de sustrato (250 μL), buffer y enzima amilasa se hacen reaccionar y se neutralizan por medio del calor a distintos tiempos de reacción (0, 5, 10, 20, 40 y 60 min). Se adiciona 1 mL del agente de color (soln. DNS al 1% conteniendo tartrato de sodio y potasio al 30% y NaOH). Se desarrolla color en un baño de agua hirviendo por 10 min. Se lee absorbancia a 546 nm. Se cuantifica por medio de la curva estándar de maltosa.

Acción de inhibidores de trigo sobre las isoamilasas de *R. dominica*

La búsqueda sistemática de inhibidores de α -amilasa de extractos biológicos, usualmente se desarrolla por la adición de un extracto de prueba a una solución buffer que contenga a la α -amilasa de estudio (Kruger, 1987), y se determina la actividad amilásica después de un apropiado tiempo de incubación.

Para este ensayo se extraen las proteínas solubles en agua del trigo descascarillado variedad Rayón (Baker, 1991). En un molino de café (marca Braun), se muelen 100 g de trigo teniendo cuidado de que no se caliente la harina y no darle mucho trabajo mecánico al molido. La harina se tamiza a través de una malla U.S. número 60. Se toma un gramo representativo de muestra tamizada y se combina con 50 mL de agua deionizada. Se extrajeron las proteínas solubles por agitación mecánica a velocidad intermedia, por una hora a temperatura ambiente. Se filtra el sobrenadante a través de papel filtro Whatman número 4. Se preparó un extracto proteico de esta solución (1:50) con buffer de ensayo. Esta solución se utilizó como extracto inhibitorio de α -amilasa (Baker, 1991).

Se realiza un ensayo de inhibición, que es similar al de cinética enzimática. Se adicionan alícuotas del extracto inhibitorio de concentración 0.28 mg/mL. Para poder determinar el porcentaje de actividad residual, se realizan los ensayos de actividad amilolítica en presencia de alícuotas de 0, 50, 100, 150 y 200 μ L del extracto inhibitorio, 375 μ L de almidón de papa y buffer de ensayo y enzima suficiente para 1 mL de solución; el tiempo de incubación es de 30 min antes de la adición del sustrato. El almidón de trigo se trata previamente con borohidruro de sodio de acuerdo a lo propuesto por Strumeyer (1972).

Los gráficos que se obtuvieron de la etapa de caracterización enzimática corresponden a ensayos con al menos duplicados y dos réplicas, se graficó la desviación estándar de cada ensayo. Se utilizó el software GraphPad Prism 5.00, mediante un ajuste de correlación no lineal para la ecuación de Michaelis-Menten para poder determinar los parámetros cinéticos de K_m y V_{max} para cada isoamilasa en los sustratos amilosa, amilopectina y almidón de trigo, que se reportan más adelante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

Se obtuvieron 3 fracciones proteicas a partir de la precipitación con sulfato de amonio: La fracción 0-25%, la 25-75% y el sobrenadante residual de la proteína precipitada con 75% de sulfato de amonio. A las fracciones obtenidas se determinó actividad amilásica y contenido de proteína para poder determinar el porcentaje de recuperación de cada fracción, siendo de 11.2% para la fracción 0-25% y del 54% de la actividad del extracto crudo para la fracción 27-75%. En el sobrenadante de la fracción 76% de sulfato de amonio se detectaron sólo trazas de actividad amilolítica al igual que trazas de proteína.

Con el objeto de conocer en cuál de las fracciones proteicas precipitadas con sulfato de amonio se encontraban las amilasas de interés, se realizaron análisis zimográficos en gel de poliacrilamida. Se observó que en todas y cada una de dichas fracciones se encontraban presentes las amilasas (dato no mostrado), pero en donde se encontraron en mayor concentración fue en la fracción precipitada con 25%-75% de sulfato de amonio. Esta fracción fue utilizada como referencia para monitorear la presencia de cada una de las amilasas en los picos de actividad eluidos mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (Fig. 5).

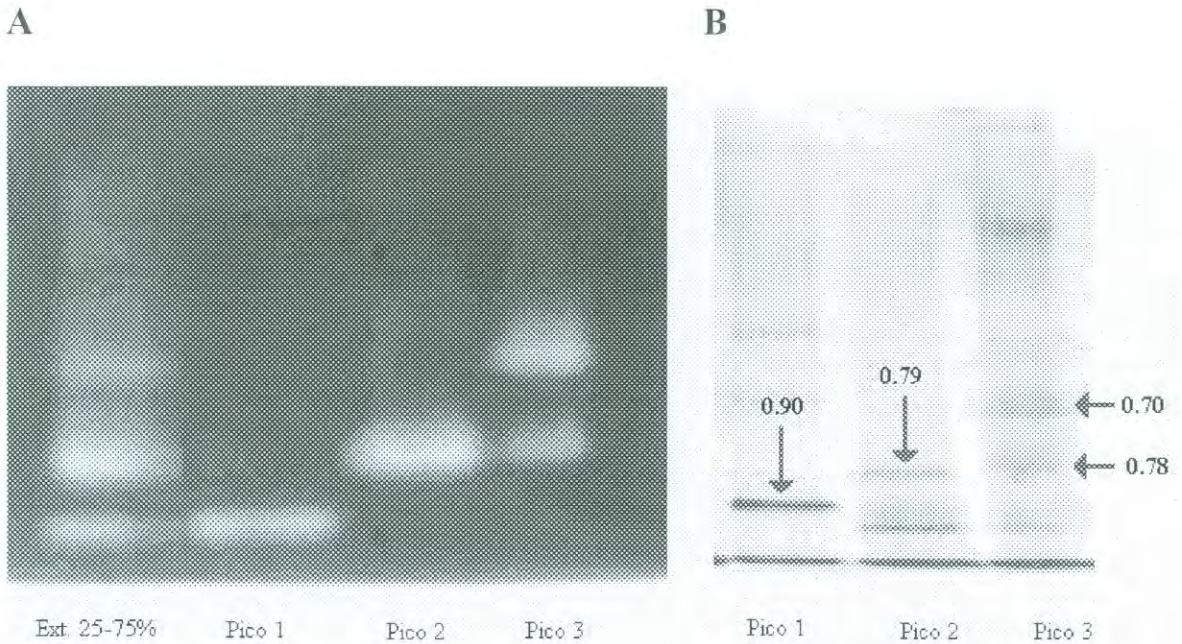


Figura 5. Análisis electroforético de las fracciones cromatográficas obtenidas de la cromatografía de interacción hidrofóbica. A) Detección de bandas de actividad amilolítica por zimografía de la fracción proteica precipitada con sulfato de amonio al 25%-75% de saturación y muestras de los picos cromatográficos eluidos de la columna de interacción hidrofóbica, y B) Electroforesis no disociante de muestras de proteína de los picos cromatográficos eluidos de la columna de interacción hidrofóbica y teñidas con nitrato de plata.

Cromatografía en fenil sefarosa CL-4B

Cinco mililitros de la fracción 25-75% (conteniendo 19.5 mg de proteína soluble) fueron inyectados en la columna cromatográfica de interacción hidrofóbica CL-4B. La elución se llevó a cabo aplicando un gradiente lineal de etilén glicol de 0 a 50% (v/v). Se recolectaron fracciones y se resolvieron tres picos con actividad α -amilásica (Fig. 6). Se recolectaron por separado los picos y se determinó su concentración de proteína y actividad amilolítica. La actividad amilolítica de todas las fracciones colectadas fue analizada *in vitro*. De igual forma, la elución de las distintas isoamilasas fue investigada por zimografía (Fig. 5). Se observó en los zimogramas que la fracción precipitada con 25-75% de sulfato de amonio contenía las isoamilasas de R_m 0.90, 0.79 y 0.70 (Fig. 5A). Estas isoamilasas fueron reportadas previamente por otros investigadores (Baker, 1991; Cinco-Moroyoqui, 2006; Alanis-Villa (2006). En geles similares teñidos con nitrato de plata fue posible detectar la presencia de múltiples isoamilasas. La Fig. 5B muestra el patrón electroforético de las muestras de proteínas estudiadas por zimografía. Se pudo observar que el pico 1 contiene la isoamilasas de R_m 0.90, el pico 2 corresponde a la isoamilasa de R_m 0.79, mientras que el pico 3 contiene hasta 4 isoamilasas. En el pico 3, la isoamilasas 0.70 está formada por 3 bandas y una adicional con un R_m aproximado de 0.78.

La Fig. 6 muestra el perfil cromatográfico de la separación de proteínas eluidas de la columna de interacción hidrofóbica. Puede observarse que una gran cantidad de proteína no se unió a la columna, mientras que las amilasas fueron retenidas. En corridas preliminares no fue posible eluir a las amilasas empleando un gradiente negativo de sulfato de amonio desde 25% a 0%. Estos resultados son indicativos del relativo alto grado de hidrofobicidad que poseen las isoamilasas. Por ello, fue necesario introducir etilén glicol para poder

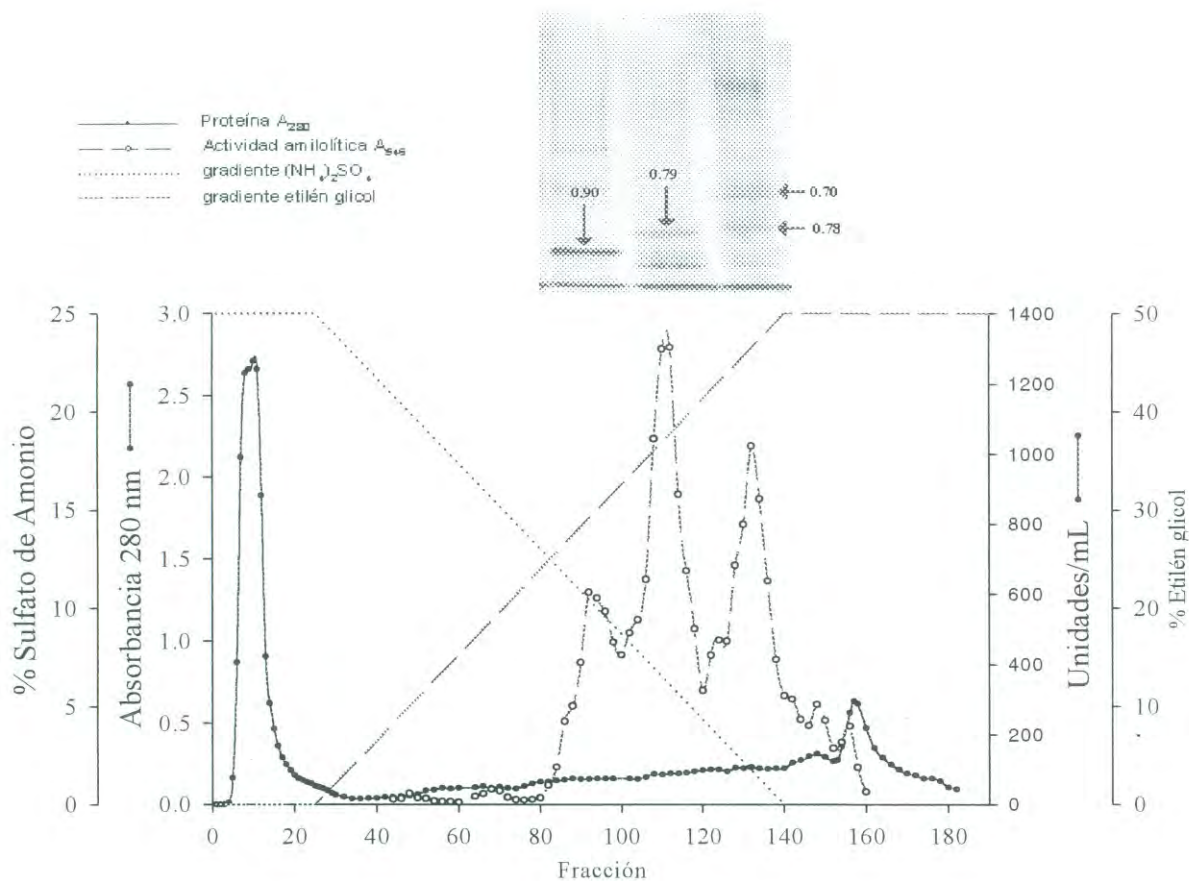


Fig. 6. Cromatografía en fenil sefarosa CL-4B de un extracto amilolítico de *Rhyzopertha dominica*. La columna fue saturada inicialmente con 25% de sulfato de amonio. La actividad amilolítica fue eluída con un gradiente de etilén glicol de 0-50% (v/v). Arriba, PAGE no disociante en tinción de plata para cada pico cromatográfico.

separarlas de la columna. La actividad amilolítica empezó a detectarse cuando la concentración de etilén glicol alcanzó aproximadamente 25% de saturación en la columna y terminó de eluir hasta 50% de saturación. La primera amilasa en eluir fue la de *Rm* 0.90 (fracciones 81 a 89), seguida por la de *Rm* 0.79 (fracciones 108 a 114), y finalmente la de *Rm* 0.70 (fracciones 130-136). De acuerdo al orden de elución, la IA 0.90 e IA 0.70 son las que poseen la menor y mayor hidrofobicidad, respectivamente.

Debido a la baja concentración de proteína con actividad amilolítica, la cromatografía de interacción hidrofóbica resultó ser una magnífica herramienta para purificar a las isoamilasas de *Rhyzopertha dominica*. Baker (1991) reportó que no le fue posible separar las isoamilasas de este insecto en cromatografía de intercambio iónico, avocándose a estudiar solamente un pico de actividad que separó en cromatografía de filtración en gel. Los estudios de caracterización de Baker (1991) los realizó con las isoamilasas 0.70 y 0.79 juntas. La isoamilasa 0.90 no fue posible detectarla en sus extractos cromatográficos a pesar de detectarla en el extracto crudo. Otros investigadores (Applebaum, 1964; Podoler y Applebaum, 1971; Campos et al., 1989) han utilizado otros tipos de cromatografía para aislar a las amilasas de distintas especies de insectos. En algunos casos, se ha empleado solamente zimografía para detectar banda(s) de actividad, y en algunos casos han complementado la detección de proteínas con azul de Coomassie, un colorante de uso común en la detección de bandas proteicas en geles de poliacrilamida. Sin embargo, el azul de Coomassie no es tan sensible como lo es el nitrato de plata para detectar concentraciones pequeñas de proteína.

Purificación de α -amilasas

Los pasos de purificación de la actividad amilolítica de *R. dominica* se muestran en la Tabla 1. Se puede observar que del total de proteína extraída de las poblaciones del insecto, solamente alrededor del 21% se obtuvo en la fracción proteica precipitada con sulfato de amonio en el rango de 25 a 75% de saturación. La cuantificación de la actividad amilolítica de esta fracción representó aproximadamente 54% del total de la actividad inicial detectada en el extracto crudo. La actividad específica y el factor de purificación se incrementaron 2.5 veces, respectivamente.

Este tipo de resultados que indican pérdidas de proteína y actividad biológica son comunes que se presenten en procedimientos de purificación de este tipo. Dado que las isoamilasas se detectaron en todas las fracciones proteicas precipitadas con sulfato de amonio, se puede deducir que la sal de amonio empleada favorece la precipitación de la proteína por el efecto del “salting out”, pero no es específica para las isoamilasas de estudio. Sin embargo, la fracción 25-75% fue la que contuvo la mayor concentración de actividad amilolítica.

Estos resultados podrían explicar en parte la dificultad de Baker (1991) de purificar a las isoamilasas de *R. dominica* mediante cromatografía de intercambio iónico. Estas proteínas no son fáciles de separar ya que poseen características de hidrofobicidad muy similares pero son capaces de mantenerse en solución en soluciones acuosas.

La purificación adicional de la actividad amilolítica en la cromatografía de interacción hidrofóbica fue altamente eficiente ya que se logró recuperar aproximadamente

Tabla 1. Etapas de purificación de la actividad amilolítica de *Rhizopertha dominica*.

Etapa de Purificación	Unidades de Actividad ¹	Proteína Total (mg)	Act. Esp. ²	% Recuperación ³	Factor de Purificación ⁴
Extracto Crudo	4110	171.1	24	--	1.0
0-25% SA	461	30.8	15	11.2	0.6
25-75% SA	2 211	36.4	61	53.8	2.5
Cromatografía de fenil sefarosa	1 862	2.4	776	45.3	32.3

¹ Unidades de actividad amilolítica. Una unidad es expresada como la cantidad de enzima que produce 1 mM maltosa/min a 30°C.

² La actividad específica se calcula como el total de unidades de actividad amilolítica/proteína total

³ El porcentaje de recuperación se calcula como la cantidad de unidades de actividad en una etapa de purificación dividido por las unidades totales del extracto crudo.

⁴ El factor de purificación se calcula dividiendo el valor de actividad específica de una etapa de purificación entre el observado en el extracto crudo.

84% de la actividad amilolítica aplicada a la columna. El porcentaje restante que no se logró recuperar fue perdido intencionalmente ya que las fracciones con actividad amilolítica en picos contiguos fueron eliminadas para evitar contaminación entre sí.

La proteína recuperada de la cromatografía de fenil sefarosa representó solamente 6.6% del total aplicado a la columna y aproximadamente 1.4% de la totalidad de la proteína presente en el extracto crudo. Sin embargo, la actividad específica tuvo un grado de purificación final de 776 y el porcentaje de recuperación de la actividad originalmente obtenida representó el 45%. Por medio de ensayos electroforéticos y zimografía, fue posible detectar las isoamilasas que eluyeron de la columna. En total, la actividad amilolítica de *R. dominica* tuvo un grado de purificación de 32.3, siendo este un valor promedio ya que cada una de las isoamilasas fueron separadas y evaluadas en su actividad por separado.

Determinación de parámetros cinéticos

Los valores de los parámetros cinéticos K_m , V_{max} y la relación V_{max}/K_m se muestran en la Tabla 2. Las determinaciones de estos parámetros se realizaron utilizando como sustratos almidón de trigo variedad Rayón, amilopectina y amilosa de maíz.

Cuando se utilizó almidón como sustrato, la isoamilasa 0.70 presentó el valor más bajo en K_m ($K_m=0.47$), mientras que los valores de este parámetro para las isoamilasas 0.79 y 0.90 fue casi similar (1.72 y 1.93, respectivamente). Estos resultados indican que la isoamilasas 0.70 tiene alta afinidad por el almidón. Sin embargo, los valores de velocidad V_{max} mostraron diferencias que no correspondieron con la magnitud de los valores de K_m .

La isoamilasa 0.79 fue capaz de producir una mayor concentración de azúcares reductores a niveles de saturación con el sustrato. Sin embargo, para poder comparar la capacidad

Tabla 2. Valores de parámetros cinéticos de α -amilasas de *Rhizopertha dominica* empleando distintos sustratos.

Sustrato	Isoamilasa	V_{max} (μ M maltosa/min)	K_m (mg sustrato/ml)	V_{max}/K_m
Almidón				
	0.70	94.0	0.47	200.0
	0.79	222.2	1.72	129.2
	0.90	145.0	1.93	75.0
Amilopectina				
	0.70	64.3	0.52	123.6
	0.79	151.4	0.57	265.6
	0.90	125.0	2.22	56.3
Amilosa				
	0.70	588.2	2.85	206.4
	0.79	2 000.0	6.66	300.3
	0.90	1 333.3	5.55	240.2

Las concentraciones de almidón y amilopectina empleadas fueron en el rango de 0-1.2 mg, mientras que para amilosa fue de 0-2 mg. Los valores son los promedios de dos determinaciones independientes.

hidrolítica de las tres isoamilasas, y dada la variación en K_m y V_{max} , se decidió comparar la cantidad de azúcares reductores V_{max} por la cantidad de sustrato K_m . Los valores de esta relación indicaron que la isoamilasa 0.70 fue la más eficiente para hidrolizar al almidón ($V_{max}/K_m=200$). De las tres isoamilasas, la 0.90 fue la que presentó una menor habilidad para hidrolizar a este sustrato ($V_{max}/K_m=75$).

Cuando la amilopectina se empleó como sustrato, se observó ligeros incremento de aproximadamente 10% y 13% en los valores de K_m para las isoamilasas 0.70 y 0.90, mientras que el correspondiente a la isoamilasa 0.79 disminuyó aproximadamente 33%, lo cual significa una reducción de 3 veces del valor observado con almidón como sustrato. Por otro lado, se observó que la magnitud de V_{max} no presentó relación con la magnitud de K_m . Aunque el valor de K_m para la isoamilasa 0.70 y 0.79 fueron los más bajos con amilopectina como sustrato (K_m de 0.52 y 0.57, respectivamente), ambas enzimas difirieron en su velocidad para producir azúcares reductores. La mejor forma para comparar la eficiencia de las tres isoamilasas fue nuevamente empleando la relación V_{max}/K_m . Los resultados demostraron que la isoamilasa 0.79 fue la más eficiente para degradar la amilopectina ($V_{max}/K_m=265.6$), seguida por la isoamilasas 0.70 ($V_{max}/K_m=123.6$) y 0.90 ($V_{max}/K_m=56.3$).

Al utilizar amilosa como sustrato, los valores de K_m se incrementaron 5.4%, 11.7% y 2.5% para las isoamilasas 0.70, 0.79 y 0.90, respectivamente, comparados con los valores observados con amilopectina como sustrato. De forma interesante, los valores de V_{max} para cada una de las tres isoamilasas con amilosa se incrementaron en promedio 10% de los valores observados con amilopectina. Los valores de las relaciones V_{max}/K_m indicaron que la isoamilasa 0.79 fue la más eficiente para hidrolizar amilosa, aunque la isoamilasa 0.90

aumentó su eficiencia 3.2 veces más que la observada con almidón, y 4.2 veces más que con amilopectina. Esto último lleva a la conclusión de que la amilosa es un buen sustrato para la isoamilasa 0.90 dados los incrementos significativos en la magnitud de la relación V_{\max}/K_m .

Patrón de acción de las isoamilasas

Las isoamilasas de *R. dominica* fueron estudiadas en su patrón de acción sobre amilopectina y amilosa. Para poder evaluar esta propiedad de las isoamilasas, fue necesario realizar dos determinaciones. Una fue la formación de azúcares reductores por la acción enzimática sobre los sustratos a través del tiempo, y la otra es la pérdida de la capacidad de formar un complejo con yodo, a lo cual se le denomina en este estudio como “Capacidad de Absorción de Iodo”. Los resultados mostraron que las tres isoamilasas se comportaron como endoamilasas, es decir, realizaron su acción hidrolítica en el interior de las cadenas de los polisacáridos dando como resultado la formación de una mayor concentración de azúcares reductores. Los fragmentos formados, debido a su menor tamaño, pierden su capacidad de absorber yodo, de tal forma que el seguimiento de la acción hidrolítica de las isoamilasas sobre los carbohidratos nos permite observar la velocidad a la cual los productos de hidrólisis dejan de absorber iodo. La Fig. 7 muestra el comportamiento gráfico de la acción de las isoamilasas sobre la amilopectina y amilosa. Cuando la amilopectina se empleó como sustrato, la acción de la isoamilasa 0.70 fue más lenta que la de las isoamilasas 0.79 y 0.90, en ese orden (Fig. 6A). La isoamilasa 0.90 produjo una baja concentración de azúcares reductores y una rápida pérdida en la capacidad de absorción de

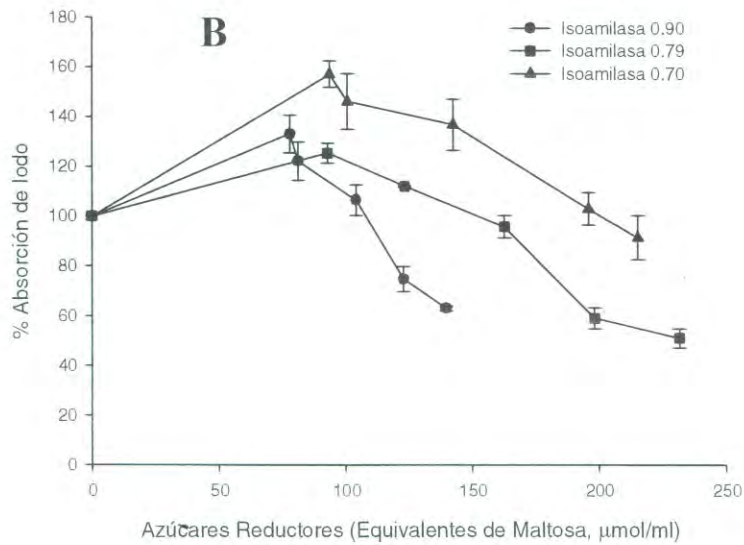
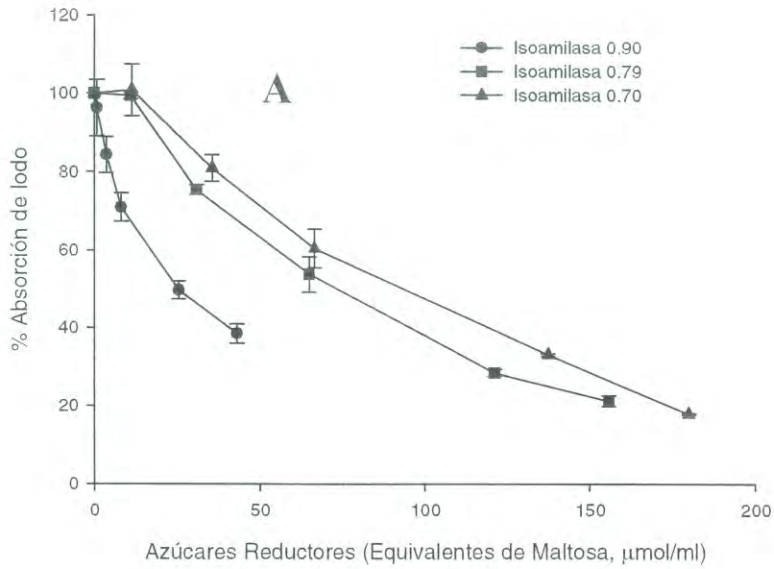


Fig. 7. Relación entre el cambio concentración de amilosa residual y concentración de azúcares reductores producida por la acción amilolítica de tres isoamilasas de *Rhizopertha dominica*. Hidrólisis con amilopectina (A) y con amilosa (B).

yodo. En contraste, las isoamilasas 0.70 y 0.79 degradaron más lentamente a la amilopectina, produciendo concentraciones de azúcares reductores más altas que las producidas por la IA0.90, pero con una gradual pérdida en la capacidad de absorción de yodo. Puede deducirse con estos resultados, que la acción de estas dos isoamilasas puede ser importante para el insecto *R. dominica* ya que su acción conduce a la formación de pequeños fragmentos de oligosacáridos los cuales no pueden absorber yodo. La amilopectina perdió aproximadamente el 80% de su capacidad de absorber yodo durante 60 min de hidrólisis. Sin embargo, las isoamilasas 0.70 y 0.79 fueron capaces de producir concentraciones significativamente altas de azúcares reductores de esta fracción de almidón en comparación con la cantidad producida por la isoamilasa 0.90 (Fig. 7A).

Cuando la amilosa fue empleada como sustrato, la acción hidrolítica de las tres isoamilasas fue completamente distinta a la observada con la amilopectina. El comportamiento gráfico se muestra en la Fig. 7B. Se puede observar que la hidrólisis de la amilosa sucedió en dos etapas. En la primera de ellas, la capacidad de absorción de yodo aumentó por la acción de las tres isoamilasas, a la vez que se observó un incremento en la concentración de azúcares reductores. Estos resultados indican que las cadenas de amilosa fueron reducidas en tamaño pero se incrementó la capacidad de absorción de yodo posiblemente debido a que se facilitó la difusión del yodo al interior de la estructura de la amilosa, y generó una mayor concentración de azúcares reductores. Es interesante hacer notar que la primera etapa de hidrólisis de cada una de las isoamilasas concluyó cuando se alcanzó una determinada concentración de azúcares reductores (aproximadamente 100 μ M maltosa). Esto último sugiere que la formación de fragmentos cortos de oligosacáridos es

necesaria antes de continuar con una hidrólisis exhaustiva del sustrato. Fue posible establecer que la isoamilasa 0.70 hidroliza menos a la amilosa en comparación con la isoamilasa 0.79 por mantener su capacidad de absorción de yodo y generar menos cantidad de azúcares reductores.

La segunda etapa de hidrólisis de la amilosa se observó cuando la capacidad de absorción de yodo empezó a disminuir. Comparativamente, las tres isoamilasas degradaron de manera distinta a la amilosa. Al igual que con la amilopectina, la degradación de la amilosa siguió un orden y la isoamilasa 0.70 es la que en menor grado disminuye la capacidad de absorción de yodo de la amilosa; mientras que las isoamilasas 0.79 y 0.90, en ese orden, hidrolizaron más exhaustivamente a la amilosa y a amilopectina con una rápida pérdida en la capacidad de absorción de yodo. Estos resultados sugieren que la isoamilasa 0.70 hidroliza en fragmentos más pequeños a la cadena de amilosa, lo cual explica la poca pérdida en la capacidad de absorción de yodo (Fig. 7B).

Determinación del pH óptimo

Dos de las tres isoamilasas fueron más activas a pH 7.0 (amilasas 0.70 y 0.79), mientras que la isoamilasa 0.90 presentó la máxima actividad a pH 6.5 (Fig. 8). Se puede observar en ambos casos que la actividad es menor a ambos lados de las curvas de actividad. Se observó que las isoamilasas 0.70 y 0.79 no presentaron actividad a valores de pH cercano a 4, mientras que la isoamilasa 0.90 presentó una actividad significativamente más elevada. Sin embargo, fue notoria la variación en actividad de esta isoamilasa tal como se puede observar en el tamaño de la barras de error a valores de pH por debajo y arriba del

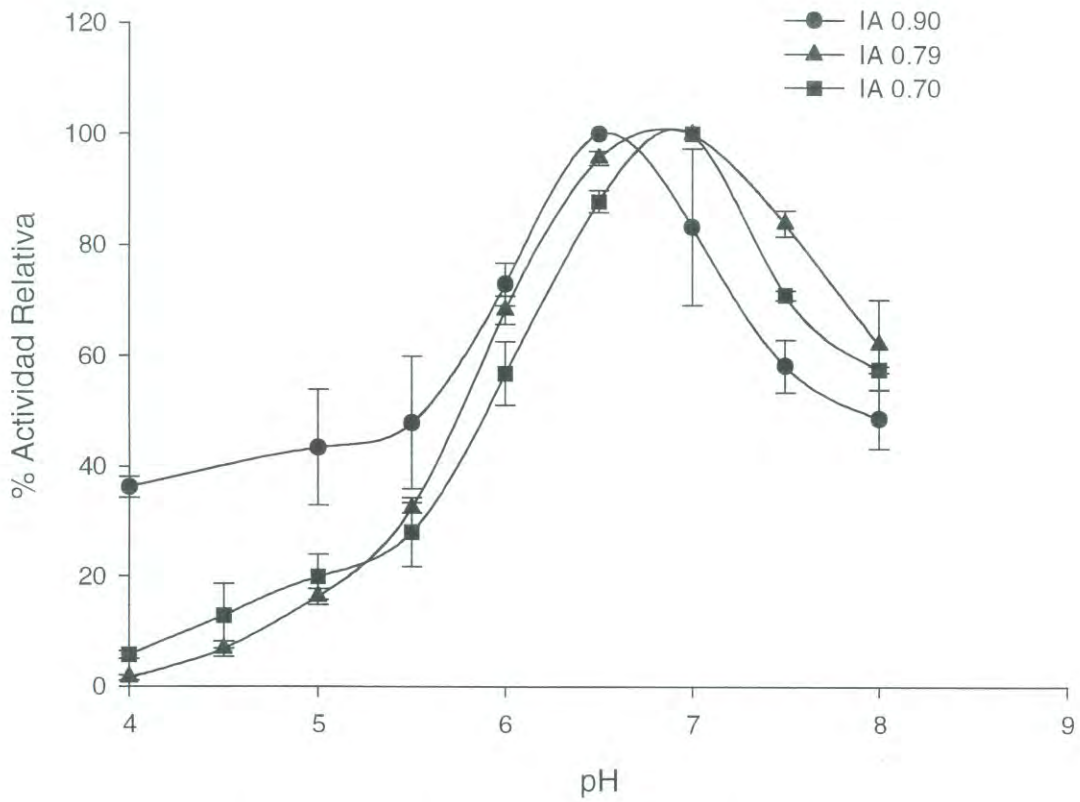


Fig. 7. Influencia del pH en la actividad isoamilásica de *R. dominica* usando almidón soluble como sustrato. Los resultados son promedio de repeticiones con dos réplicas

óptimo de actividad (Fig. 7). Baker (1991) reportó un valor óptimo de pH de 7.0 para la actividad amilolítica de extractos crudos de *R. dominica*, además de que observó un máximo de actividad en el rango de pH de 4-5. Otros coleópteros tales como *Callosobruchus chinensis* mostraron un pH óptimo de 5.2-5.4 (Podoler & Applebaum, 1971), para *Tenebrio molitor* se reportó un pH de 5.8 (Buconore et al., 1976), y para *Callosobruchus maculatus* el pH óptimo varió entre 5.2 y 6.0 (Campos et al. 1989). En este sentido, las isoamilasas de *R. dominica* difieren en pH óptimo para actuar sobre la fracción carbohidrato de los cereales de los que se alimenta.

Estabilidad térmica

Las tres isoamilasas se evaluaron en su estabilidad al calor a 50°C y a 60°C. La prueba de estabilidad térmica a 50°C mostró que las tres isoamilasas fueron altamente estables reteniendo toda su actividad amilolítica durante 1 h de exposición a esta temperatura (Fig. 9). En contraste, las tres isoamilasas perdieron el 50% de su actividad en 20 min a 60°C y fueron inactivadas completamente en 1 h a esta temperatura.

Los resultados de esta prueba indican que es posible que *R. dominica* podría sobrevivir fácilmente a 50°C debido a que su actividad amilolítica no es inactivada, permitiéndole hidrolizar el almidón del grano sin restricciones.

Influencia del β -mercaptoetanol sobre la actividad amilásica

El β -mercaptoetanol es un agente reductor el cual rompe los enlaces disulfuro de las proteínas, destruyendo la estructura cuaternaria de las proteínas, cuya unión de subunidades a través de estos puentes, con lo cual la enzima se desdobra en sus polipéptidos constituyen-

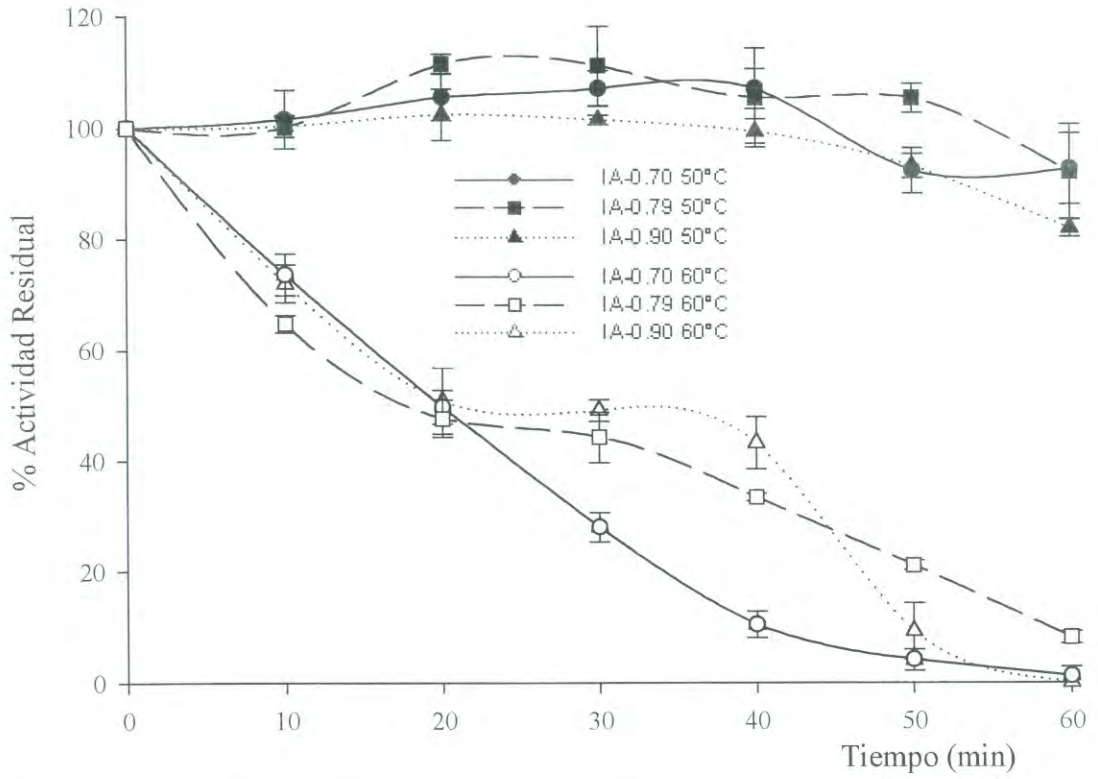


Fig. 9. Estabilidad térmica de las isoamilasas de *Rhyzopertha dominica* a 50°C y 60°C. Los valores son el promedio de dos determinaciones con duplicados y desviación estándar.

tes, o bien, en aquellos enlaces que tienen participación dentro del sitio activo (Conn y Stumpf, 1986). Sin embargo se han reportado que ciertas enzimas muestran un aumento en actividad en presencia de este compuesto reductor.

Se realizaron ensayos de actividad amilolítica con buffer de ensayo enriquecido con β -mercaptoetanol 10, 20, 30, 40 y 50 mM. El comportamiento para las tres IA fue similar, por que todas ellas incrementaron su actividad hidrolítica, alcanzándose el máximo a 30 mM de β -ME (Fig. 10). Estos resultados sugieren que las isoamilasas son monómeros y que su sitio activo no está asociado a enlaces disulfuro. La presencia del β -ME aumentó la actividad de las isoamilasas hasta 2.5 veces más a 30 mM de concentración. Este incremento en actividad podría explicarse en el rompimiento de enlaces disulfuro abriendo la molécula y permitiendo una mayor difusión del sustrato hacia el sitio activo (Barrett *et al*, 2004).

Acción de inhibidores de trigo sobre las isoamilasas de *R. dominica*

El grano de trigo contiene ciertas proteínas de la fracción albúmina que son capaces de reducir la actividad amilásica de ciertos insectos, particularmente de aquellos que se alimentan de cereales (Silano et al., 1975; Baker, 1991). *R. dominica* se alimenta y desarrolla preferentemente del trigo, pero su ataque es variable dependiendo de la actividad inhibitoria α -amilásica que posee éste (Cinco-Moroyoqui *et al.*, 2006). Estudios realizados por Baker (1991) y Cinco-Moroyoqui et al. (2006) han demostrado que la actividad amilolítica de *R. dominica* es altamente susceptible por albúminas de trigo. Alanis-Villa (2006) utilizó extractos de albúminas de líneas isogénicas de trigo variando ampliamente en su actividad inhibitoria y encontró que, aún con las líneas isogénicas más activas, no era

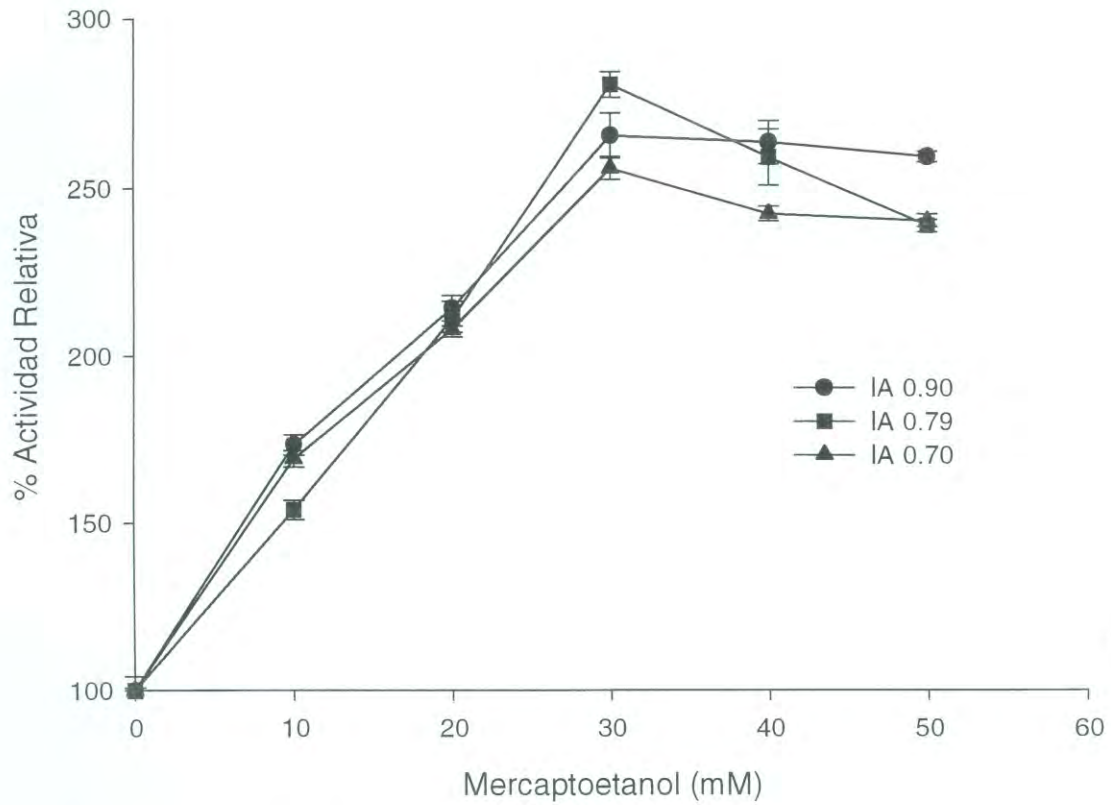


Fig. 10. Influencia del β -mercaptoetanol sobre la actividad de las isoamilasas de *Rhyzopertha dominica*. Los valores son el promedio de 2 determinaciones y su desviación estándar.

posible inhibir completamente la actividad amilásica del insecto. Sin embargo, estos estudios no emplearon las isoamilasas de *R. dominica* separadas o purificadas, de tal manera que no fue posible establecer cuál o cuáles de las isoamilasas eran las responsables de la actividad residual observada por otros autores.

En el presente estudio se determinó la influencia de un extracto inhibitorio de albúmina extraída de la variedad de trigo Rayón sobre la actividad de las tres isoamilasas de *R. dominica*. Los resultados mostraron que las isoamilasas 0.70 y 0.79 fueron rápidamente inactivadas por concentraciones muy bajas de proteína albúmina. La isoamilasa 0.70 perdió aproximadamente 70% de su actividad en presencia de alícuotas que contenían 14 μg de albúmina de trigo, mientras que la isoamilasa 0.79 perdió solamente 40% de su actividad inicial (Fig. 11). Cuando se emplearon 28 mg de albúmina en la mezcla de reacción, la isoamilasa 0.70 fue inactivada completamente, mientras que la isoamilasa 0.79 perdió aproximadamente 80% de su actividad inicial. Ambas IA fueron inactivadas cuando se combinaron con 42 μg de albúminas en la mezcla de reacción. En contraste a la alta susceptibilidad de estas isoamilasas a la acción inhibitoria por albúminas de trigo, la isoamilasa 0.90 no fue inhibida y retuvo completamente su actividad aún a concentraciones de 56 μg de albúminas de trigo en la mezcla de reacción.

Los resultados de este análisis permiten deducir que *R. dominica* puede sobrevivir en granos de trigo aún cuando éstos posean altas concentraciones de inhibidores. Puede ser posible que la resistencia de la isoamilasa 0.90 a ser inhibida, le permita al insecto la habilidad para continuar alimentándose y reproduciéndose, aunque lentamente, en el grano de trigo. Cinco-Moroyoqui *et al.* (2006) observaron que *R. dominica* se reproduce en menor

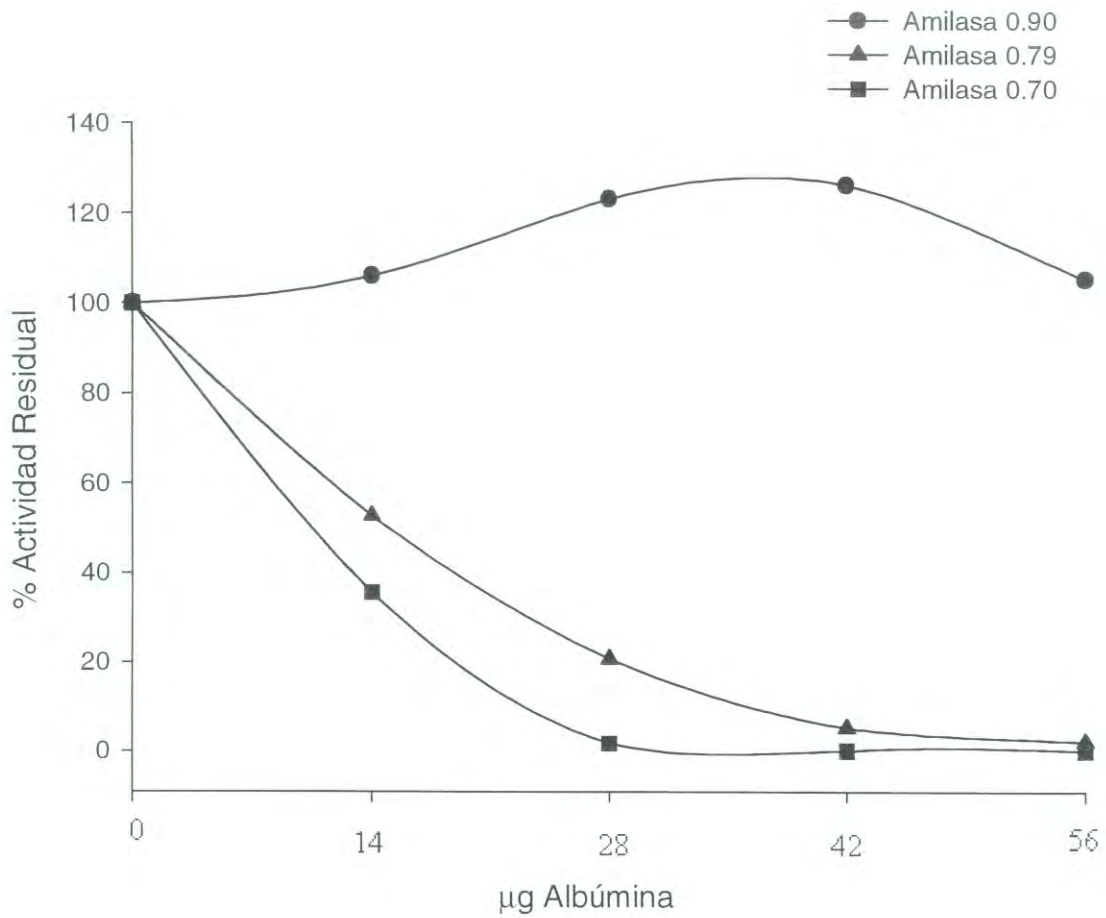


Fig. 11. Actividad residual ante la inhibición de albúminas de trigo Rayón para IA de *Rhizopertha dominica*.

número en variedades de trigo con alta actividad inhibitoria. Sin embargo, estos investigadores reportaron que *R. dominica* siempre fue capaz de infestar variedades de trigo en mayor o menor grado.

CONCLUSIONES

Fue posible purificar parcialmente a las isoamilasas de *Rhyzopertha dominica* mediante precipitación en sulfato de amonio del extracto crudo, seguido por cromatografía de interacción hidrofóbica en fenil sefarosa CL-4B.

Se resolvieron 3 picos con actividad amilásica, el pico 1 está compuesto por una IA de movilidad relativa 0.90 (IA-0.90), el pico 2 presentó una isoamilasa (IA-0.79), mientras que el pico 3 presentó 4 isoamilasas (3 isoamilasas comprendían a la banda proteica reportada con anterioridad por Baker, como isoamilasa de R_m 0.70, y una IA adicional con un valor de R_m de 0.78).

Se obtuvo un grado de purificación de 32.3 para las IA en conjunto, usando almidón como sustrato; la actividad amilásica recuperada en la etapa de purificación fue del 85%, por lo que la cromatografía de interacción hidrofóbica en fenil sefarosa demostró ser una poderosa herramienta para purificar a las isoamilasas de *R. dominica* en un solo paso.

Las IA 0.70 y 0.79 fueron más activas a pH 7 y la IA-0.90 lo fue a pH 6.5. Las tres IA presentan una alta estabilidad térmica a 50°C, pero a 60°C pierden la mitad de su actividad a los 20 min. El β -mercaptoetanol aumenta la actividad amilásica de las isoenzimas hasta 2.5 veces a una concentración de 30 mM.

Los valores de K_m en almidón soluble para las IA de *R. dominica* son similares a los reportados para otros insectos (Podoler y Applebaum, 1971; Buonocore, 1976; Baker, 1983, 1991). Se observó que cada IA presenta diferente afinidad para amilosa, amilopectina y almidón soluble. Las IA-0.70 y 0.79 tienen mayor eficiencia hidrolizando amilopectina y la IA-0.90 con amilosa.

El patrón de acción de las tres IA indica el comportamiento típico de las endoamilasas debido a que disminuyen rápidamente la capacidad de absorción de yodo por el almidón. Cada IA presenta diferencias en la producción de azúcares reductores, pero las IA-0.70 y 0.79 producen mayor cantidad de equivalentes de maltosa con almidón y amilopectina.

Las IA-0.70 y 0.79 son rápidamente inactivadas por bajas concentraciones de proteína albúmina provenientes del trigo hexaploide variedad Rayón, mientras que la IA-0.90 no fue inhibida y retuvo completamente su actividad hidrolítica.

Las isoamilasas de *R. dominica* son proteínas monoméricas que difieren en grado de hidrofobicidad, movilidad electroforética, parámetros cinéticos, afinidad con distintos sustratos y grado de inhibición con mezcla de albúminas de trigo entero.

La baja susceptibilidad de inhibición de la IA-0.90 es un factor importante por el que *R. dominica* puede reproducirse con éxito en distintas variedades de trigo. La acción simultánea de los 3 grupos de isoamilasas facilita al insecto la alimentación y reproducción en los granos de trigo.

RECOMENDACIONES

- Purificar a las isoenzimas aquí estudiadas mediante transferencia Western para posteriores análisis de caracterización molecular empleando técnicas más específicas que permitan explicar la interacción de las isoenzimas con inhibidores purificados de trigos de distintas variedades de la región.
- Determinar propiedades físicoquímicas de reacción enzima-sustrato, enzima-inhibidor y de la cinética de hidrólisis (entalpía de formación, constante de unión, dispersión de luz, etc.)
- Determinar la afinidad de cada isoamilasa para almidones de distintas variedades de trigos de la región, que permita mostrar si existe una relación entre la susceptibilidad del ataque por *R. dominica* con la afinidad amilásica de sus enzimas.
- Tratar de explicar el motivo de la preferencia de las IA por amilosa y el mecanismo de acción en otros sustratos mediante la caracterización de los productos de hidrólisis.
- Durante la realización del presente trabajo se observó que la electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% presenta una mayor resolución para la detección de isoamilasas y que había bandas protéicas que no se resolvieron a una concentración el 7.5% de acrilamida como los llevados a cabo por otros estudios de isoenzimas en insectos, por lo que se sugiere confirmar reportes similares.

BIBLIOGRAFÍA

- Agricultural Research Service. 1986. Stored-Grain Insects. United States Department of Agriculture. Washington, D. C. USA.
- Alanis-Villa, A. 2006. Estudio comparativo en la actividad α -amilásica de líneas isogénicas de trigo y su efecto en la actividad amilolítica de *Rhyzopertha dominica* Fab. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora.
- Applebaum, S.W. 1964. The action pattern and physiological role of *Tenebrio* larval amylase. *J. Insect Physiol.* 10: 897-906
- Applebaun, S.W., Konijn, A.M. 1965. The utilization of starch by larvae of the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *J. Nutr.* 85:275-282.
- Asgher, M., Javaid M., Rahman S.U., Legge R.L. 2005. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *J. Food Eng.* 79: 950-955.
- Baker J.E. 1991. Purification and partial characterization of α -amylase allozymes of the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Insect Biochem.* 21(3): 303-311.
- Baker, J.E. y Woo S.M. 1985. Purification, partial characterization, and postembryonic levels of amylases from *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus granarius*. *Archs Insect Biochem. Physiol.* 2: 415-428.
- Barrett A., Rawlings N., Woessner J. 2004. Handbook of proteolytic enzymes. 2^a edición. Ed. Elsevier. U.K.
- Bell, J.E. 1988. Proteins and enzymes. Ed. Prentice Hall Inc. New Jersey. USA. pp. 314-316.

- Bernfeld, P. 1955. Amylase, α and β . Methods in Enzymology. vol. 1 S.P. Colowick y N.O. Kaplan, eds. Academic Press.
- Bouconore, V., Poerio, E., Silano, V., Tomasi, M. 1976. Physical and catalytic properties of alpha-amylase from *Tenebrio molitor* L. larvae. Biochem.J. 153:621-625.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analyt. Biochem. 72, 248-254.
- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A. y Osman, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkalophilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. Proc. Biochem. 38: 1397-1403.
- CAMINOLT. 2007. Cámara de la Nacional de la Industria Molinera de Trigo. México. Última actualización, 2 de agosto 2007. <http://www.harina.org/>
- Campos, F.A.P., Xavier-Filho, J., Silva, C.P., Ary, M.B. 1989. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). Comp. Biochem. Physiol. 92B: 51-57.
- Cinco-Moroyoqui, F.J., Rosas-Burgos, E.C., Borboa-Flores, J., Cortez-Rocha, M.O. 2006. α -amylase activity of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) reared on several wheat varieties and its inhibition with kernel extracts. J. Econ. Entomol. 99:2146-2150.
- Conn, E., Stumpf, P.K. 1986. Bioquímica fundamental. 3a edición. Editorial Limusa. México, D.F.

- Davidson, R.H. 1992. Plagas de insectos agrícolas y del jardín. Ed. Limusa. México. D.F. pp. 639.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121: 404-427
- Dawson, R.M.C., D.C. Elliott. 1969. Data for Biochemical Research. Precipitation techniques. 2nd ed. Ed. Oxford Univ. Press, London. pp. 291.
- Dell'Ortyo Trivelli, H. 1985. Insectos que dañan granos y otros productos almacenados. Anais da maesa redonda Latinoamericana sobre Pós-colheita de graos, Vicoso, Brasil. Pp. 193-231
- Dowdy, A.K. 1994. Flight initiation of lesser grain borer (Coleoptera: Bostrichidae) as influences by temperature, humidity, and light. J. Econ. Entomol. 87: 1714-1717.
- Edde, P.A. y Phillips, T.W. 2006. Field responses of non-target species to semiochemicals of stored-product Bostrichidae. Annals. Entom. Soc. Ame. 99: 175-183.
- Evans D.E. y Dermott T. 1981. Dosage-mortality relationships for *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) exposed to heat in a fluidized bed. J. Stored Prod. Res. 17: 53-64.
- FAO, 1994. Agricultural services bulletin No. 93. Agricultural engineering in development: Post-harvest operations and management of food grains. FAO consultants M. de Lucia and D. Assennato. Roma, Italia.
- FAO. 1985. Prevención de pérdidas de alimentos poscosecha: manual de capacitación. Depto. de Agricultura. Roma, Italia.

- FAO. 1999. Proyecciones para los cereales hasta el año 2005. Comité de problemas de productos básicos. Roma, Italia.
- Fields, O.G., J. van Loon, M.G. Dolinski, J.L. Harris. 1993. The distribution of *Rhyzopertha dominica* (F.) in West Canada. J. Canadian Entomol. 125:317-328.
- Fisher, E.H. y Stein, E.A. 1960. α -amylase, in: The enzyme, 2a ed. Academic Press Inc. New York. pp. 313-143.
- Franco, L., Rigden, D., Melo, F., Grossi-de-sa, M. 2002. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases structure, function and potential for crop protection. Eur. J. Biochem. 269: 397-412.
- Frels, J.M. y Rupnow, J.H. 1984. Purification and partial characterization of two α -amylase inhibitors from black bean (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Biochem 8:281.
- GE Healthcare Bio-Sciences AB. 2002. Phenil sepharose CL-4B. Instructions. Edition AC. Sweden. pp. 2-7.
- Golebiowska Z. 1969. The feeding and fecundity of *Sitophilus granarius* (L.), *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F.) in wheat grain. J. stored Prod. Res. 5: 143-155.
- González, A.U. 1995. El maíz y su conservación. Editorial Trillas. México. pp. 290, 177-180.
- Guedes C.R.N., S. Kambhampati, B.A. Dover. 1997. Allozymes variation among Brazilian and U.S. populations of *Rhyzopertha dominica* resistant to insecticides. Entom. Exp. Appl. 84: 49-57. Belgium
- Guedes, R.N.C. 1990. Manejo integrado para a protecao de graos armazenados contra insetos. Rev. Bras. Armazen. 15: 3-48.

- Guedes, R.N.C., Zhu, K.Y., Kambhampati, S., Dover, B.A. 1997. Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzoperta dominica* F. population from the United States and Brazil. *Bull. Entomol. Res.* 87:581-586.
- Hartree, E.F. 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry procedure that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48: 422-427.
- Hendriksen, H.V., Pedersen, S. y Bisgard-Frantzen, H. 1999. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. Patent application WO 99/35325.
- Hewitt, C.J. y Solomons, G.L. 1996. The production of α -amylase (E.C.3.2.1.1.) by *Bacillus amyloliquefaciens*, in a complex and a totally defined synthetic culture medium. *J. Ind. Microb.* 17: 96-99.
- INEGI. 2006. El sector alimentario en México. Serie de estadísticas sectoriales. Edición 2006. pp. 19-21, 40-41.
- IUPAC. 1997. Compendium of Chemical Terminology. 2nd Edition. <http://www.iupac.org/publications/compendium/E.html>
- IUPAC. 2007. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they catalyze. <http://www.iubmb.unibe.ch/>.
- Knutson, C. A. 1986. A simplified colorimetric procedure for determination of amylose in maize starches. *Cereal Chem.* 63:89-92.
- Kruger, J. E. 1986. Enzymes and their role in cereal technology. Ed. AACC. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 141-161.

- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins During the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lehninger A.L. 1985. Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular. 2ª edición. Ed. Omega S.A. Barcelona. pp. 161-185.
- Leveque, E., Janeck, S., Haye, B. y Belarbi, A. 2000. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enz. Microb. Tech.* 26: 3-14.
- Lin, L.L., Chyau, C.C. y Hsu, W.H. 1998. Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotech. Appl. Biochem.* 28: 61-68.
- Longstaff, C.B. 1999. An experimental and modelling study of the demographic performance of *Rhizopertha dominica* (F.) and development rate. *J. Stored Prod. Res.* 35: 89-98.
- López, A.G.F. 1985. Manejo integrado de plagas. En: Cursos de orientación para el buen uso y manejo de plaguicidas. Funes, C. et al. Editado por Asociación Mexicana de la industria de plaguicidas y fertilizantes, A.C. México, D.F. pp. 27-38.
- Marchylo, B.A. 1987. Methods for the purification and separation of cereal enzymes and their multiple forms, in: *Enzymes and their role in cereal technology*. Kruger, J.E. Ed. AACC. St. Paul, Minnesota. pp.37-46.
- Market, C.L. y Moller, F. 1959. Multiple forms of enzymes. Tissue, ontogenetics and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 45: 753
- Markham, R.H., Writht, V.F., y Rios, I.R. 1991. A selective review of research annotated and updated bibliography. *Ceiba. Tegucigalpa, Honduras.* 32 (1): 66-72.

- Mathews, C.K., van Holde, K.E., Ahern, K.G. 2004. Bioquímica. Ed. Addison Wesley. España. Pp. 528-529.
- McTigue, M.A., Kelly, C.T., Doyle, E.M. y Fogarty, W.M. 1995. The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD370. *Enz. Microb. Tech.* 17: 570-573.
- Merril, C.R., Goldman D., Sedman S.A. y Ebert M.H. 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211, 1437-1538.
- Mersch, C. 1985. Plaguicidas utilizados para la protección de granos y productos almacenados. En: Cursos de orientación para el buen uso y manejo de plaguicidas. Funes, C. et al. Editado por Asociación Mexicana de la industria de plaguicidas y fertilizantes, A.C. México, D.F. pp. 299-308.
- Morón, M.A. y Terrón, R.A. 1988. Entomología Práctica. Ed. Instituto de Ecología. México, D.F. pp. 112-120.
- Myrback, K. y Neumuller, G. 1950. The enzyme: Chemistry and mechanism of action. 1a ed. Vol 1 Academic Press. New York.
- Ouye, M.T. 1984. An overview of post Harvest insect research performed by USDA. ARS Laboratories. In: Insect management for food storage and processing. F.J. Baur. Ed. AACC. St. Paul, Minnesota. pp. 44-46.
- Pacheco, M.F. 1985. Plagas de los cultivos agrícolas en Sonora y baja California. En Moron, M.A. y Terrón, R.A. 1988. Entomología Práctica. Editado por el Instituto de Ecología. México, D.F. pp. 44-46.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, V.T., Sing, D., y Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotech. Appl. Biochem.* 31: 135-152.

- Podoler, H., Applebaum, S.W. 1971. The α -amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis*. Biochem. J. 121:321-325.
- Potter, C. 1935. The biology and distribution of *Rhyzopertha dominica* (Fab.) Transactions of the royal entomological society of London. 83:449-482.
- Price N.R. 1984. Active exclusion of phosphine as a mechanism of resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). J. Stored Prod. Res. 20: 163-168.
- Ramírez G.M. 1980. Almacenamiento y conservación de granos y semillas. Ed. CECOSA. México. D.F. 7^a reimpresión. pp. 31, 40-41, 162-165.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Gathe, M.S. y Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. Microb. Mol. Biol. Reviews 62: 597-635.
- Ress, P.D. 1996. Coleoptera Capítulo 1. In: Integrated management of insects in stored product. Subramanyam, B. and Hagstrum, W.D. Marcel Dekker, New York. Pp. 7-33.
- Serna S., S.O. 1996. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. AGT editor. México, D.F. pp. 3-4, 15-18.
- Sidhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T. y Gupta, J.K. 1997. Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. Enz. Microb. Tech. 1: 525-530.
- Sifuentes, A.J.A. 1979. Plagas de los granos almacenados y su control. Folleto de divulgación No. 68. SARH-INIA. México. pp. 31-36

- Silano, V., Furia, M., Gianfreda, L., Macri, A., Palescandolo, R., Rab, A., Scardi, V., Stella, V., Valfre, F., 1975. Inhibition of amylases from different origins by albumins from the wheat kernel. *Biochem. Biophys. Acta* 391:170-178.
- Srinivasan, R., Ruckenstein, E. 1980. Role of physical forces in hydrophobic interaction chromatography. *Separation & Purification Methods* 9. pp 267–370.
- Stauffer, C. 1989. *Enzymes Assays for Food Scientists*. Van Nostrand Reinhold/AVI, New York.
- Strobl, S; Maskos, K; Betz, M; Wiegand, G; Huber, R; Gomis-Rueth, F.X; Frank, G; Glockshuber. 1998. Crystal structure of yellow meal worm alpha-amylase at 1.64 Å resolution. *European Bioinformatics Institute. R. J. mol. boil.* 278, pp. 617-28.
- Strumeyer, D.H., 1967. A modified starch for use in amylase assays. *Anal. Biochem.* 19:61-71.
- Stryer, L. *Bioquímica*. Ed. Reverte, España. p.p. 189-222.
- Stuart, E.B. 1993. *Hydrophobic interaction chromatography. Principles and methods*. Ed. Amersham Pharmacia Biotech, edition AB. San Francisco, CA. pp. 11-18.
- Tsao, C.Y., Hsu, Y.H., Chao, L.M. y Jiang, S.T. 2004. Purification and characterization of three amylases from viscera of hard clam *Meretrix lusoria*. *J. Fish. Sci.* 70: 174-182.
- Watts, V. M., Dunkel, F.V. Montana State University-Bozeman
<http://www.montana.edu/wwwai/imsd/vanessa/lab.html>. Consultada el 7 de septiembre del 2007.
- Whistler, R.L., Bemiller, J.M., Paschall, E.F. 1984. *Starch: Chemistry and Technology*. 2a ed. Academic Press Inc.

- Wong, F., Borboa, J., Cortez, M. 1987. Distribución y abundancia de insectos de granos almacenados en el Estado de Sonora. *Postcos.* 7:25-29.
- Yetter, M.A., Saunders, R.M., Boles, H.P. 1979. Alpha-amylase inhibitors from wheat kernel as factors in resistance to postharvest insect. *Cereal Chem.* 56:243-244.
- Zúñiga T. 1985. Conceptos básicos de entomología y manejo de plagas. En; Frijol. Schoonhoven, A. y V. Flores. Ed. Centro interamericano de Agricultura tropical. Colombia. pp. 231-240