

Amilasas Alfa y Beta a partir de un extracto de *Manihot esculenta*

HUMBERTO ESCALANTE H.

Ingeniero Químico M.Sc.

GRACIELA CHALELA A.

M.Sc. rer. nat.

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo el encontrar una nueva fuente de enzimas hidrolizantes. Se investigó sobre cada una de las partes de la planta de yuca, la cual a los pocos días de cosechada el tubérculo presenta sacarificación.

En el mecanismo de extracción y purificación propuesto, para estas enzimas, se establecieron las siguientes etapas: reducción mecánica de tamaño, centrifugación, diálisis continua, precipitaciones y cristalizaciones (con solventes orgánicos y sales) y cromatografía de intercambio iónico. Se construyó un dializador con circulación continua de difusato, mientras que el dializato se recirculó en circuiro cerrado para mantener la agitación y las condiciones de transferencia constantes. El proceso de transferencia de masa se caracterizó, para los tubos de diálisis 250-7 SIGMA CHEMICAL COMPANY, determinando el coeficiente total de transferencia de masa $K_L a$, a partir de un modelo matemático.

INTRODUCCION

Actualmente en nuestro país existe un marcado interés por encontrar nuevas fuentes, entre ellas las naturales renovables, para la obtención de alimentos o de combustibles líquidos. Esto se consigue utilizando una materia prima rica en hidratos de carbono, fácilmente transformables en azúcares fermentables, por medio del proceso de hidrólisis.

Las amilasas, (catalizadores orgánicos) que juegan un papel muy importante en la industria cervecera, en la panadera, en la textil, en la de adhesivos, etc. se obtienen a par-

tir de:

- a) vegetales y cereales como el trigo y la malta,
- b) de microorganismos como hongos y bacterias y
- c) de órganos de algunos animales como páncreas de cerdo, de conejo, de gato, etc.

La localización biológica ubica a la yuca dentro de las **Euforbiacéas**, cuya importancia radica en que el género *Manihot* produce raíces comestibles cuya principal característica es la capacidad de almacenamiento de almidón (polisacáridos), razón para considerarla hasta el momento, la parte de esta planta de mayor importancia industrial. La yuca posee también enzimas, que la ayudan en sus procesos vitales; su presencia o su contacto con el interior de la célula acelera las reacciones químicas, tales como desarrollo, respiración y metabolismo de sus sustancias nutritivas. El tubérculo de yuca parece rápidamente, se deteriora a los pocos días de cosechada, llegando a un estado de endulzamiento, que posiblemente no es más sino el desdoblamiento de los carbohidratos en azúcar. Por esta razón y además teniendo en cuenta que las enzimas pueden extraerse normalmente a partir de una gran variedad de seres vivos, surgió la inquietud de analizar completamente el contenido proteínico de toda la planta de yuca, buscando encontrar una buena fuente de amilasas.

SUSTRATO VEGETAL: YUCA (*Manihot esculenta*)

La familia de las Euforbiacéas que incluyen yerbas, arbustos, árboles y a veces hasta cactiformes, está formada por unas 90 especies. El género *Manihot* Adans, tiene en América una importancia excepcional. Constituye la base de la alimentación de nuestro pueblo en los climas templados y cálidos, su cultivo es bastante fácil y se presta a un gran desarrollo industrial y comercial. La yuca objeto de estudio en el presente trabajo tiene la siguiente clasificación: (15)

- orden : Geraniales
- familia : Euforbiacéas
- género : *Manihot*
- especie : *Esculenta*

LAS PROTEINAS COMO ENZIMAS

Una enzima es una proteína (grandes polímeros cuyas unidades monoméricas son los ami-

noácidos) de origen natural que cataliza reacciones biológicas con determinada especificidad; sin su presencia la gran mayoría de las reacciones químicas en las células biológicamente activas tardarían mucho tiempo o simplemente no se efectuarían. Las enzimas al igual que los otros catalizadores solo aceleran las reacciones que son termodinámicamente posibles (4).

Tecnología enzimática

La tecnología de las enzimas comprende los siguientes pasos:

- Encontrar una buena fuente con alto rendimiento, ya sea vegetal, animal o de microorganismos, para obtener una enzima específica a emplear en un proceso técnico.
- Aislar y purificar la enzima deseada.
- Conseguirla en una forma óptima para el empleo técnico, por ejemplo inmovilizarla en una resina.
- Desarrollar los dispositivos apropiados para llevar a cabo los procesos técnicos.
- Comprobar que la realización de los procesos por vía enzimática es más ventajosa técnica y económicamente que llevarlos a cabo sin recurrir a las enzimas.

Siendo la tecnología enzimática tan extensa el presente trabajo sólo versa sobre los dos primeros tópicos.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ENZIMAS

Preparar una enzima, con fines técnicos, se inicia con la obtención de un extracto crudo de la enzima; los procedimientos más comunes son:

- Ruptura mecánica, por molienda o trituración. Cuando se detecta la presencia de una enzima en una fuente biológica se requiere reducir la materia prima a partículas del menor tamaño posible ya sea por cortado o trituración, molienda con abrasivos, congelación y descongelación, desintegración sónica, tratamientos con mezclas disolventes o disminución repentina de la presión.
- Fraccionamiento: se lleva a cabo con una solución salina que se encarga de liberar las proteínas contenidas en la célula. Sulfato de amonio, sulfato sódico, sulfato de calcio y acetato sódico son sales utilizadas como extractores. Los restos de la células se separan por centrifugación o filtrado (18).

Amilasas

Las amilasas o enzimas amilolíticas son de cuatro tipos diferentes y se diferencian entre ellas por la manera en que hidrolizan los enlaces químicos del almidón: las alfa y beta amilasas atacan los enlaces glucocídicos alfa (1-4), las glucomilasas los enlaces (1-4) y finalmente las del grupo de amilopectinas (1-6) glucosidasas hidrolizan exclusivamente los enlaces (1-6). Las más importantes son las alfa y beta que reciben este nombre por que al incubarse con una solución de amilosa las primeras aumentan la rotación óptica, mientras que las segundas la reducen; ya que el almidón está compuesto de dos fracciones: amilosa y amilopectina, de tamaño molecular variable. La amilosa contiene sólo enlaces alfa (1-4) glucocídicos y las alfa y beta amilasas deberán hidrolizarla completamente hasta maltosa.

La amilasa alfa se conoce como enzima licuante, ya que al hidrolizar los enlaces químicos del almidón, al azar reduce rápidamente la viscosidad de las dispersiones de este polímero dando como producto dextrinas, maltosa y glucosa. Las amilasas alfa constituyen un grupo de proteínas homogéneas; son ligeramente acídicas, solubles en agua y tienen un peso molecular de 50000 y contienen al menos un átomo de calcio por molécula, el cual es esencial para la actividad de la enzima (7). Pueden inhibirse por acción de polifenoles oxidados, arcillas, ácido ascórbico, algunos alcoholes y EDTA a pH 4 y 11.

Las amilasas beta hidrolizan enlaces alfa (1-4) glucocídicos en el almidón y el glicógeno con una inversión de la configuración de alfa y beta. En general tienen pesos moleculares más altos que las amilasas alfa; son proteínas simples y pueden inhibirse con polifenoles oxidados, arcillas y otros absorbentes. Su pH óptimo se encuentra entre 5 y 6 y son más sensibles al calor que las amilasas alfa.

Actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática siempre se basa en la habilidad que tiene la enzima para atacar el almidón gelatinizado o susceptible; por esta razón los mejores métodos para determinarla son aquellos que cuantifican la formación de grupos reductores o producción de maltosa o glucosa. Entre estos se encuentra el que utiliza ácido 3,5 dinitrosalicílico (10), que se basa en la reducción que sufre este ácido por la presencia de grupos reductores en medio básico y la subsiguiente determinación colorimétrica del producto. La actividad de una enzima es la medida de la cantidad de sustrato que bajo condiciones apropiadas de pH y temperatura cambia a producto con el tiempo. La

determinación de una enzima en un extracto crudo no es medible normalmente, por un método directo, debe recurrirse a la determinación de su actividad enzimática.

Una unidad de actividad amilásica se define como la cantidad de maltosa(mg) liberada en 15 minutos a 37 grados centígrados, por mg de proteína utilizada para la incubación, empleando como sustrato almidón soluble al 1%.

Tecnología de membranas

Una purificación inicial del extracto se consigue haciéndolo pasar a través de una barrera imperfecta, es decir una membrana, que se encargue de retener moléculas de acuerdo al tamaño. En la actualidad la tecnología de membranas ha empezado a ser aplicada en prácticamente todo tipo de proceso tecnológico como alternativa o complemento de las operaciones clásicas de concentración y fraccionamiento: tales como diálisis, ultrafiltración y ósmosis inversa.

Diálisis

La diálisis es una operación unitaria que hace uso de una membrana semipermeable para separar, concentrar, o fraccionar moléculas en solución de acuerdo con su tamaño y configuración. La fuerza impulsora que promueve la separación es la diferencia de concentración entre ambos lados de la membrana. La membrana de diálisis retiene macromoléculas (1000 Dalton) dejando pasar a través de sí moléculas de tamaño menor como mono o disacáridos, sales minerales y agua (23).

DESARROLLO EXPERIMENTAL

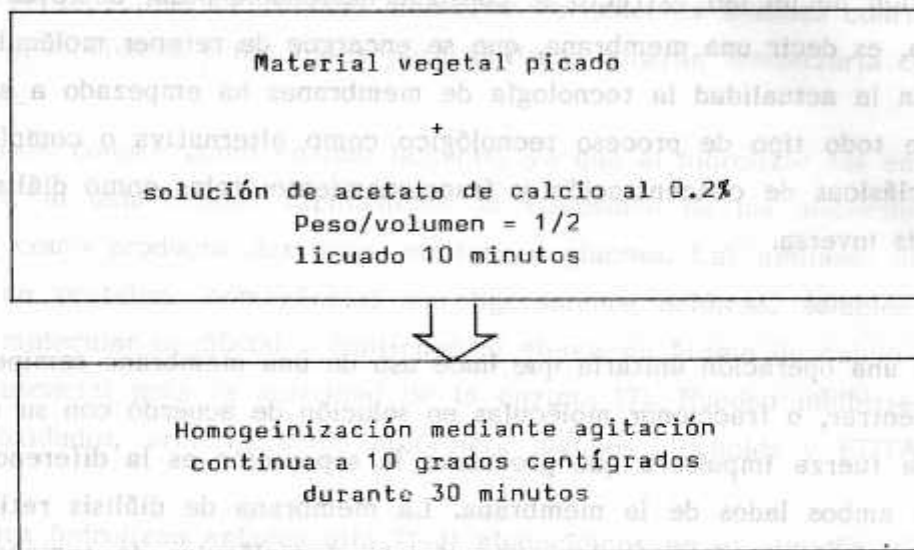
Fuente vegetal

Las plantas de yuca utilizadas provienen de la finca "La Rosa", municipio de Florida-blanca, a cuyo terreno se le efectuó un análisis químico completo, ya que la riqueza del suelo influye directamente en el estado, composición y calidad del producto. La recolección se efectuó en la mañana con el fin de obtener el material fresco.

Descripción del proceso

- Determinación de humedad y proteínas totales (por el método de Kjeldhal) (4) a cada una de las partes de la planta.

- Preparación inicial de muestra: el material vegetal recolectado se seleccionó, se lavó y se secó; en el tubérculo se descartó la cáscara.
- Reducción de tamaño: las hojas y el tubérculo se cortaron en pedazos pequeños y el tallo, debido a su consistencia fue necesario rayarlo obteniéndose una pasta.
- Extracción mecánica: se realizó en dos etapas así:



- Determinación de proteínas en los extractos: se utilizó el método fotocolorimétrico de Folin-Lowry (1).
- Determinación de actividad enzimática, se utilizó el método del ácido 3-5 dinitrosalicílico (10).
- Separación física. La solución obtenida anteriormente además de las proteínas contiene pigmentos, lípidos, impurezas y otros constituyentes vegetales que se hace necesario retirar del material vegetal, que le servía de soporte, mediante una fuerza física (centrifugación). El sobrenadante, o primer extracto impuro, es el producto de esta operación.

Para determinar el tiempo y velocidad óptimo de centrifugación se tomó como parámetro controlante la actividad enzimática; obteniéndose condiciones de extracción de 15000

r.p.m. y 20 minutos.

Luego de esta etapa los extractos se conservaron en nevera y las diferentes pruebas efectuadas sobre ellos se realizaron en baño de hielo con sal.

Para la operación de diálisis se construyó un dializador con un tubo de vidrio de 5 cm de diámetro interno y 44 cm de longitud, con salida y entrada laterales para el difusato; concéntrico a este tubo se colocó la membrana de diálisis 250-7 de SIGMA CHEMICAL COMPANY, con entrada superior y salida inferior para el dializato. Además para conservar las condiciones de temperatura requeridas se adicionó al equipo una chaqueta de vidrio de 14 cm x 15 cm x 38 cm, con entrada y salida laterales, la cual podía mantenerse con circulación de agua helada o en el mejor de los casos servía de depósito a un baño de hielo con sal.

Coefficiente total de transferencia de Masa

El mecanismo de diálisis se rige por la ley de Fick (16):

$$j = -D.A.dc/dx \quad (1)$$

Esta expresión determina que el flujo, $j=[g/s]$, de una materia a lo largo de una distancia corta, dx , es proporcional al gradiente negativo de la concentración $(-dc/dx)$ en esta distancia y al área del frente de difusión, $A(\text{cm cuadrados})$. La constante de proporcionalidad que da como resultado la igualdad de la ecuación es la difusividad, $D(\text{cm cuadrados/s})$. (14). Si el valor de la distancia x , en la ecuación (1) es relativamente constante en cualquier diseño de dializador, las variables más importantes que determinan el proceso serán: la diferencia de concentración y la superficie, siendo D una constante a cualquier temperatura específica, en el caso de una especie química concreta. Teniendo en cuenta esto se puede escribir de nuevo la ecuación así:

$$j = -K_* .A \bar{\Delta}c \quad (2)$$

Aquí $\bar{\Delta}c$ es una diferencia de concentración adecuadamente definida (g/cm^3 cúbicos). En esta forma en la ecuación aparece una nueva constante de proporcionalidad, K_* , el coeficiente total de transferencia de masa, definido como:

$$K_* = \frac{\text{Unidad de flujo}}{\text{Fuerza motriz}} \quad (3)$$

K^* tiene unidades de longitud/tiempo y es independiente de la $\bar{\Delta c}$ en la gama de concentraciones que se experimenta en el proceso.

Si se vuelve a enunciar la ecuación (2), el flujo por unidad de superficie puede expresarse como:

$$j/A = \frac{-\bar{\Delta c}}{1/K^*} = \frac{\bar{\Delta c}}{R} \quad (4)$$

Esta ecuación demuestra que sólo puede mejorarse el flujo por unidad de superficie aumentando la fuerza motriz o disminuyendo la resistencia.

Para propósitos de comprensión cuantitativa de la transferencia de masa dentro del dializador, se puede esquematizar de la forma siguiente:

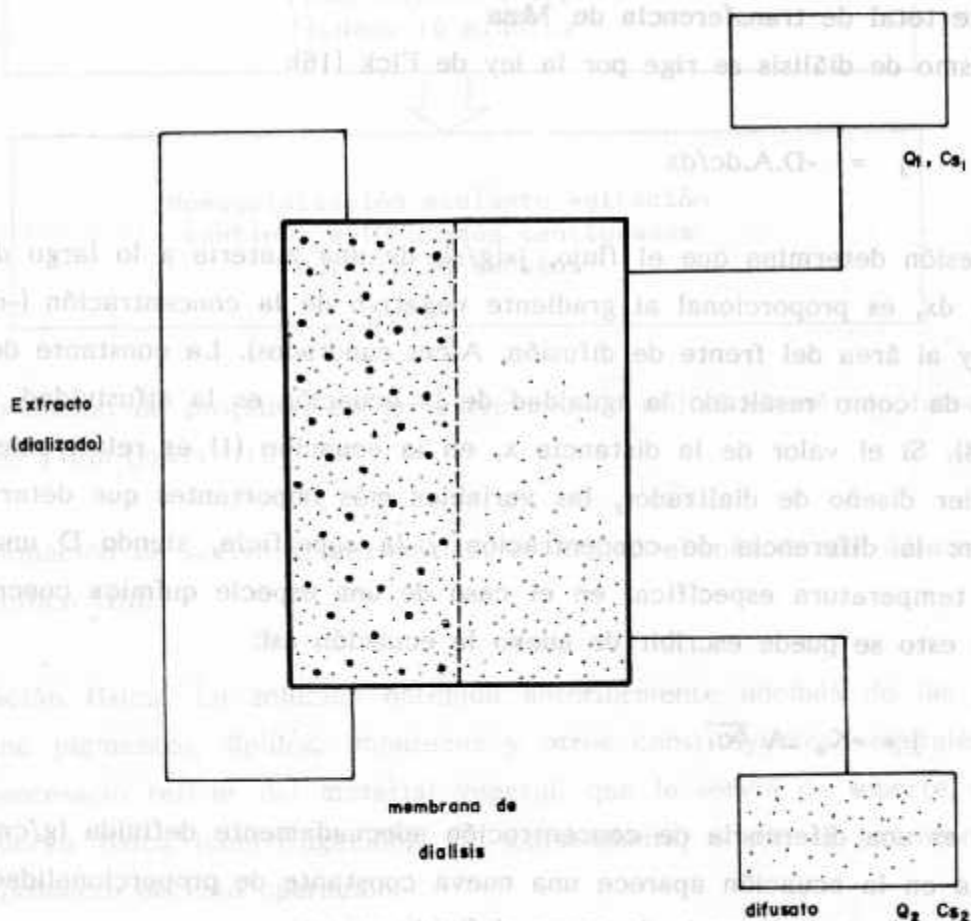


FIGURA 1 REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL PROCESO DE DIALISIS DISCONTINUA.

La operación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

- Diálisis contra solución de acetato de calcio al 0.2%.
- El difusato (flujo que abandona el dializador) lleva consigo moléculas de bajo peso molecular.
- La recirculación continua (de dializato) permite mantener condiciones de mezcla perfecta.
- Los procesos de difusión se rigen por la ley de Fick.
- Las propiedades físicas a ambos lados de la membrana son constantes e independientes de la concentración.
- Sólo una especie química se está removiendo del extracto hacia el difusato.
- El volumen dentro del dializador se considera constante.

Haciendo un balance de masa para el soluto fuera del saco de diálisis:

$$- Q.C_s + A.K_*.(C_{si} - C_s) - d(VI.C_s)/dt \quad (5)$$

donde:

C_{si} = concentración de soluto dentro del saco de diálisis, g/(cm cúbico)

C_s = concentración de soluto en el difusato, g.(cm cúbico)

VI = volumen del difusato, cm cúbicos

Q = velocidad volumétrica de difusato, ml/s

Planteando un balance soluto dentro del saco de diálisis:

$$- K_1.(C_{si} - C) = d(V2 . C_{si})/dt \quad (6)$$

donde:

$V2$ = volumen del saco de diálisis, cm cúbicos

La solución simultánea de las ecuaciones (5) y (6) permite a partir de datos de concen-

tración (tanto de difusato como de dializato) caracterizar el transporte de masa, es decir encontrar el valor del coeficiente total de transferencia de masa. Ya que era difícil cuantificar las impurezas retiradas del extracto enzimático a partir de métodos como sólidos totales, se optó por tomar como elemento cuantificable, para el transporte a través de la membrana, el ion calcio presente en la solución de acetato de calcio al 0.2%, con la cual se dializó. Las determinaciones de concentraciones se realizaron por el método tritimétrico del EDTA para cuantificar calcio a bajas concentraciones.

AISLAMIENTO DE AMILASA ALFA

Con el proceso de diálisis se consiguió aumentar la actividad enzimática pero ya que las dos enzimas hidrolizan paralela y simultáneamente el almidón, es necesario separarlas para lograr cuantificar e identificar la importancia de cada una de ellas.

Tratamiento Calórico.

Teniendo en cuenta que la amilasa beta, presente en el extracto dializado, interfería en la cuantificación de la actividad enzimática de la amilasa alfa, ésta se inactivó por calentamiento a 70 grados centígrados durante 10 minutos a un pH de 6.5. Este tratamiento calórico también logra inactivar otros componentes proteínicos sensibles al calor. En la figura 2. se esquematiza el proceso para la purificación de amilasa alfa a partir de una fuente vegetal.

AISLAMIENTO DE AMILASA BETA

Hasta la diálisis las etapas iniciales fueron idénticas a las empleadas para la purificación de amilasa alfa. En este proceso se requiere de acuerdo con las recomendaciones de Mc Gregor y colaboradores (12), inactivar la amilasa alfa disminuyendo el pH del extracto a 3,7 (con ácido acético 5 N) y manteniendo a estas condiciones la solución durante 6 días. En el esquema 3 se resumen las etapas requeridas en este proceso de purificación.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

TABLA N. 1.-

Contenido inicial de proteínas totales

Hojas	-	26,7%
Tallo	-	5,2%
Tubérculo	-	1,2%

Las diferencias que pueden existir entre estos resultados y algunos reportados por otras fuentes bibliográficas se debe a las variedades de yuca. Se puede observar que el contenido de proteínas es bajo, luego el de enzimas será menor, debido a que no toda proteína es enzima.

En la presentación de resultados se utiliza la siguiente nomenclatura:

- P : concentración de proteínas en p. p. m.
 A_{α} : actividad amilásica alfa, en p. p. m. de maltosa.
 A_{β} : actividad amilásica beta, en p. p. m. de maltosa.
 $(U.A.)_{\alpha}$: unidades de actividad específica de amilasa alfa en mg maltosa/mg proteína.
 $(U.A.)_{\beta}$: unidades de actividad específica de amilasa beta en mg maltosa/mg proteína.

TABLA N. 2.-

Proteínas y actividad enzimática en extractos crudos

Extractos	P	A_{α}	$(U.A.)_{\alpha}$	A_{β}	$(U.A.)_{\beta}$
Tallo	5463,39	2101,16	5,94	1225,45	5,42
Hojas	3541,54	1609,31	6,69	881,66	3,83
Tubérculo	495,55	416,84	12,94	235,81	7,32

Tiempo óptimo de diálisis

Se dializaron extractos de cada una de las partes de la planta, determinándose por medio de la actividad enzimática, un tiempo promedio de diálisis para todos los extractos de 8 horas.

Los diferentes extractos dializados, contra solución de acetato de calcio al 0,2% alcanzaron un aumento considerable de actividad enzimática, la cual puede deducirse de la

siguiente tabla, donde %I -porcentaje de incremento- se define como:

$$\%I = \frac{\text{Actividad Ext. crudo} - \text{Actividad Ext. dializado}}{\text{Actividad Ext. crudo}}$$

TABLA N. 3

Proteínas y actividad enzimática en extractos dializados

Ext.	P	A α	(U. A.) α	%I	A β	(U. A.) β	%I
Hojas	1897,6	911,93	7,39	5,76	577,33	4,68	22,19
Tallo	910,24	853,68	14,42	143,97	676,34	11,43	110,88
Tuberculo	238,93	300,35	19,33	49,44	181,31	11,67	59,40

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

Es un proceso que involucra el intercambio reversible de iones entre una resina insoluble (material de intercambio iónico) y una sustancia ionizable (que se encuentra en la solución) (19). Con el fin de garantizar la actividad enzimática de las amilasas se recomienda para esta purificación la Dietilaminoetil-N-celulosa o Carboximetil-celulosa, pero debido al costo de estas resinas se optó por ensayar la AMBERLITA ANIONICA "Bayer Lewatic S-109".

Para realizar la etapa de cromatografía de intercambio iónico y determinar el efecto de la Amberlita sobre la enzima se prepararon soluciones con los patrones comerciales de amilasas alfa. (ver figura N. 4).

ASLAMIENTO DE AMILASA ALFA

En el siguiente cuadro se resumen las condiciones de actividad enzimática alcanzada en cada una de las etapas del proceso de purificación de la misma alfa; las cuales se han indicado en el diagrama N.2 con los numerales I, II y III.

TABLA 4.- Extracto de hojas

Etapa I			Etapa II			Etapa III		
P	A_{α}	(U.A.) $_{\beta}$	P	A_{α}	(U.A.) $_{\beta}$	P	A_{α}	(U.A.) $_{\beta}$
6040,9	1714,71	4,36	900,01	591,58	10,12	4889,81	2030,9	6,38

TABLA 5.- Extracto de tallo

Etapa I			Etapa II			Etapa III		
P	A_{α}	(U.A.) $_{\beta}$	P	A_{α}	(U.A.) $_{\beta}$	P	A_{α}	(U.A.) $_{\beta}$
1256,94	2593,02	3,30	196,16	475,08	37,25	11560,2	2663,3	3,54

TABLA 6.- Extracto de tubérculo

Etapa I			Etapa II			Etapa III		
P	A_{α}	(U.A.) $_{\beta}$	P	A_{α}	(U.A.) $_{\beta}$	P	A_{α}	(U.A.) $_{\beta}$
417,45	649,82	23,94	235,25	562,45	36,78	648,04	577,01	13,69

Los resultados obtenidos con los tres extratos presentaron un comportamiento muy similar, destacándose el aumento de la actividad específica en la etapa de mezcla y después que el alcohol se retira, por centrifugación, la actividad decrece considerablemente (etapa III).

Etapa de cromatografía de intercambio iónico

En esta etapa, a los eluentes recolectados se les midió la actividad y estos resultados se graficaron para obtener el cromatograma y analizar el rendimiento alcanzado por la amilasa alfa (ver Figura 5, 6 y 7).

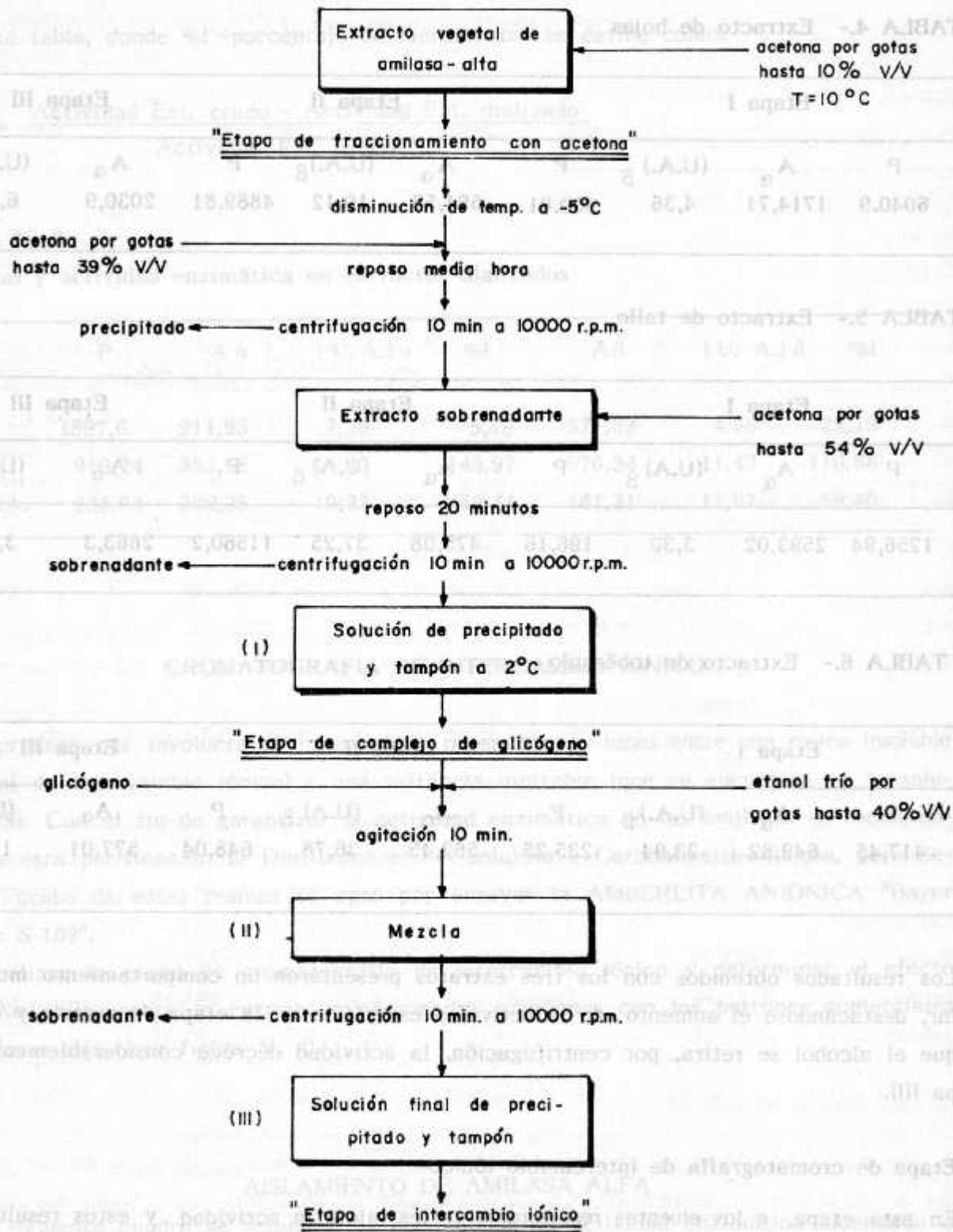
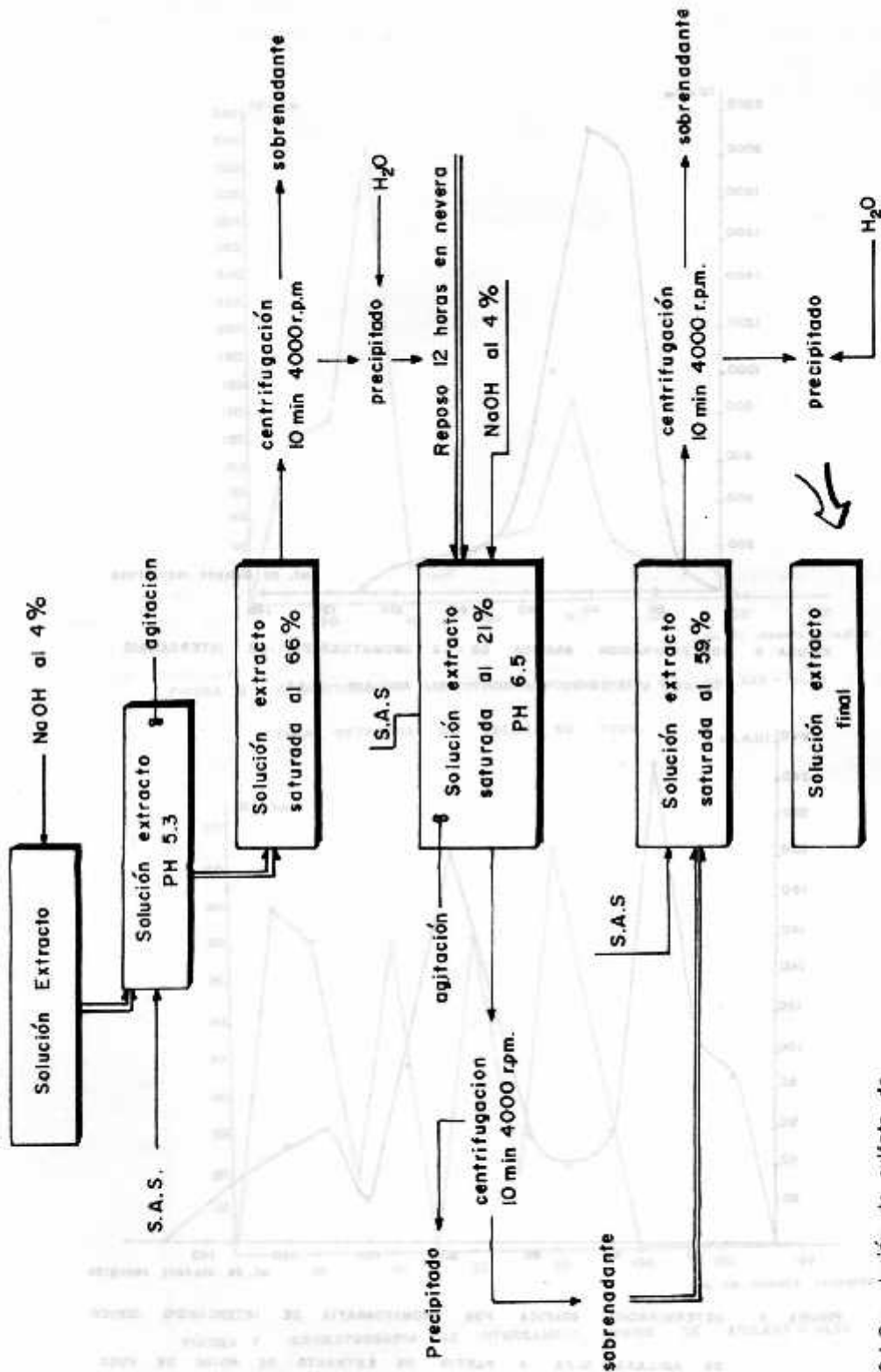


FIGURA 2 ESQUEMA PARA LA PURIFICACION DE AMILASAS ALFA A PARTIR DE UNA FUENTE VEGETAL



S.A.S.: solución de sulfato de amonio saturada

FIGURA 3 ESQUEMA PARA LA PURIFICACION DE AMILASAS - BETA

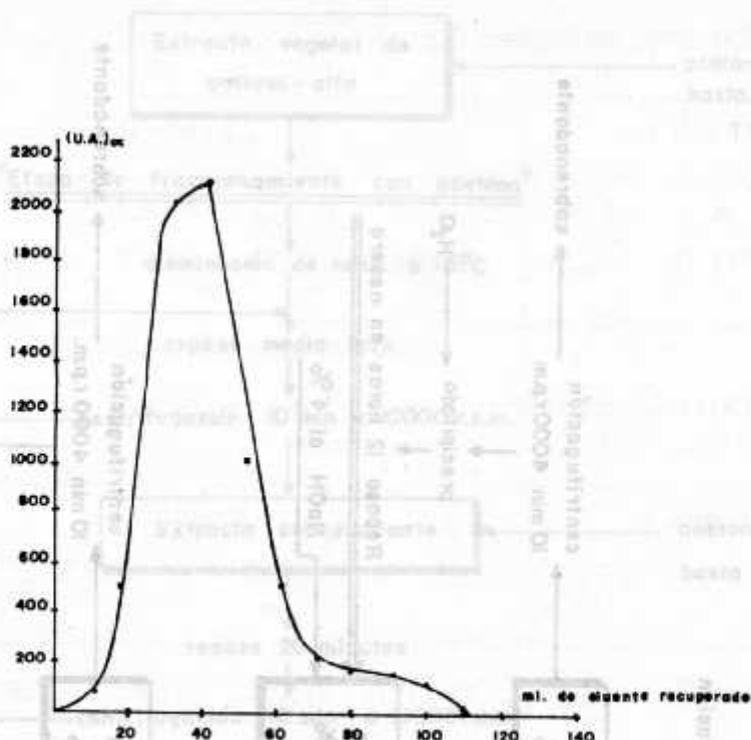


FIGURA 4 DETERMINACION GRAFICA DE LA CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO UTILIZANDO PATRON DE AMILASA - ALFA

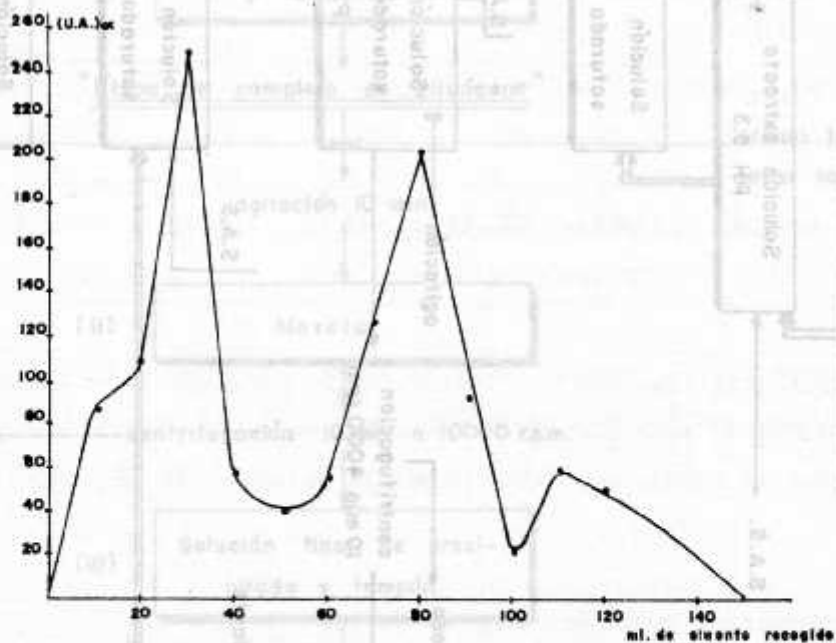


FIGURA 5 DETERMINACION GRAFICA POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE AMILASA - ALFA A PARTIR DE EXTRACTO DE HOJAS DE YUCA.

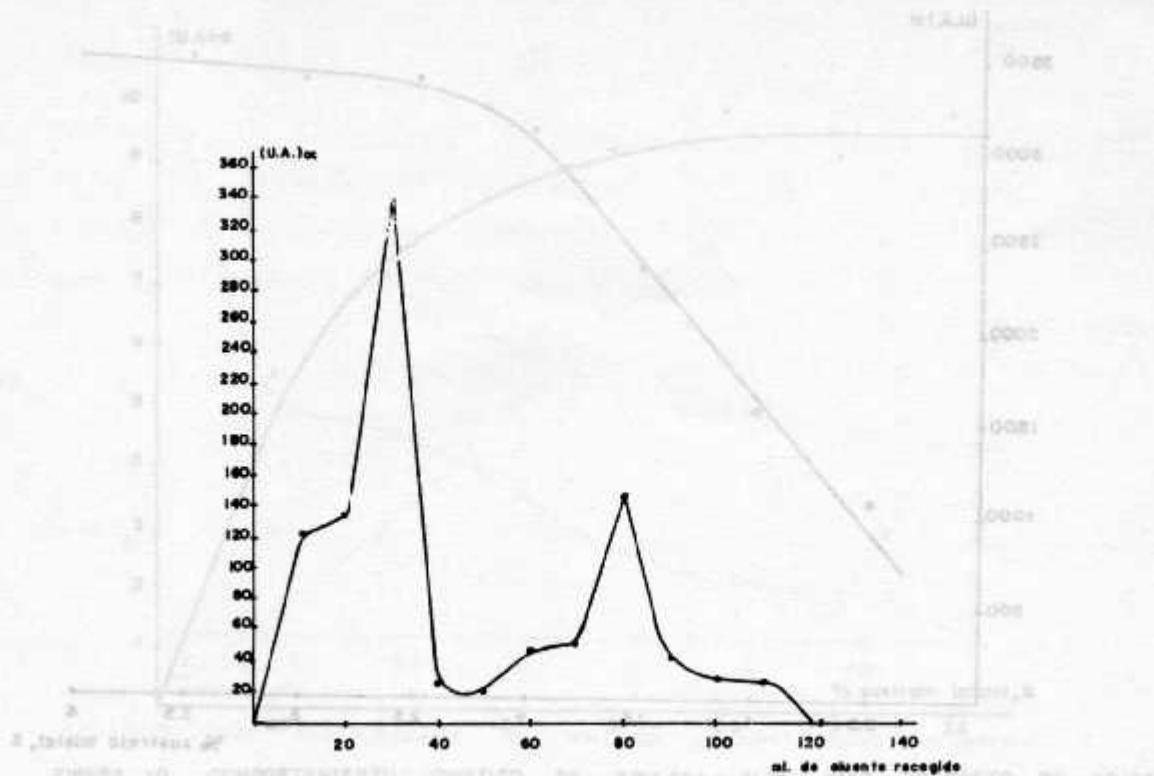


FIGURA 6 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE AMILASA - ALFA PARA EXTRACTO DE TALLO DE YUCA.

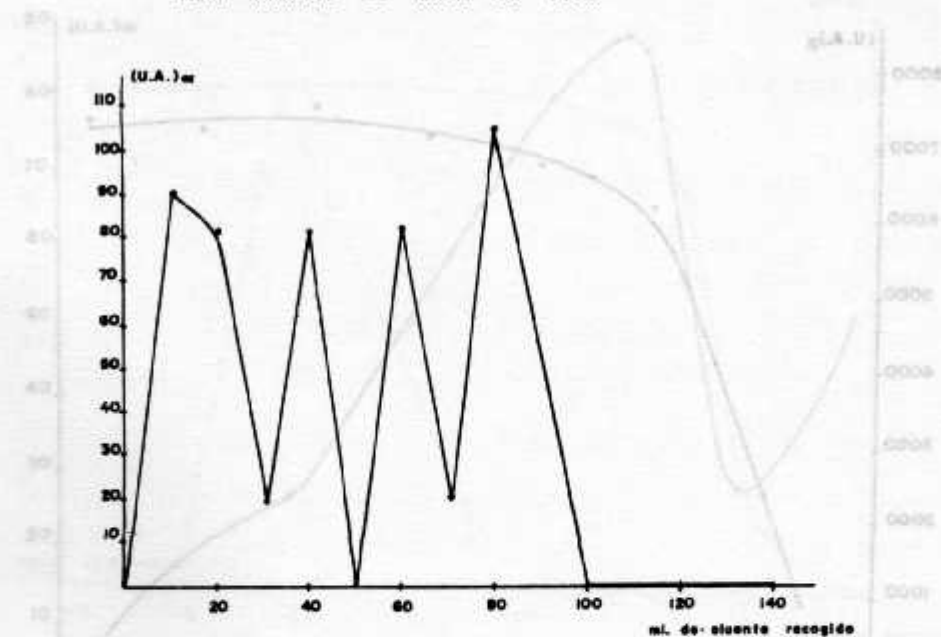


FIGURA 7 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE AMILASA - ALFA PARA EXTRACTO DE TUBERCULO DE YUCA.

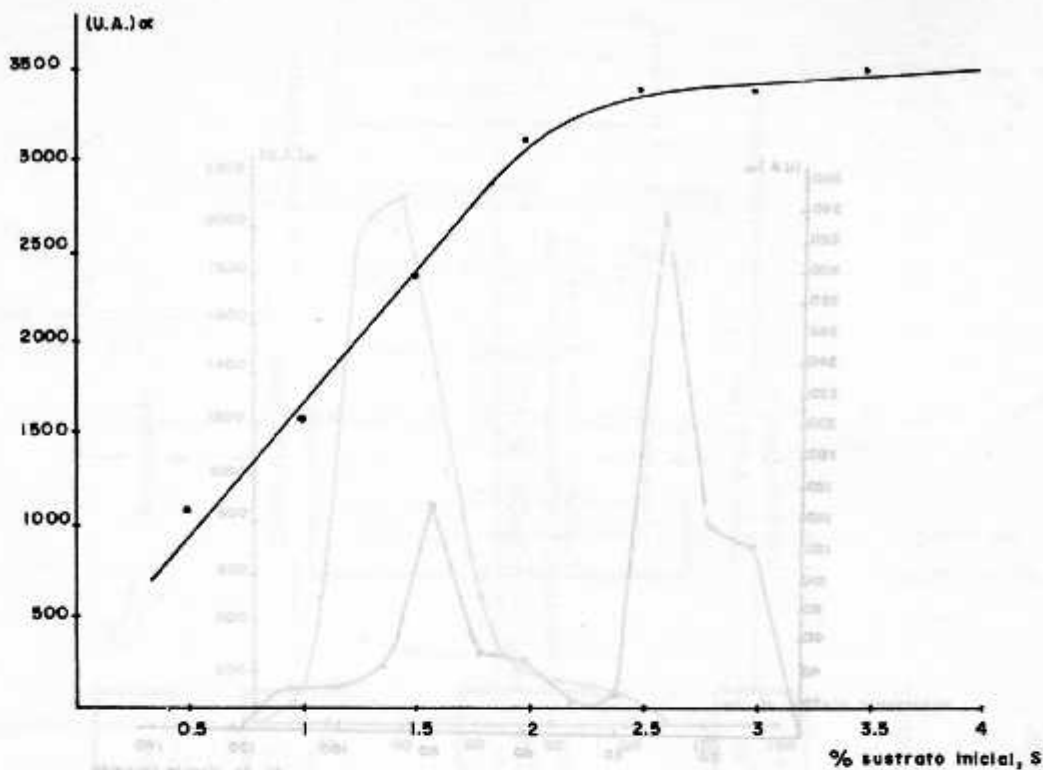


FIGURA 8 COMPORTAMIENTO CINÉTICO PARA EL PATRON DE AMILASA ALFA

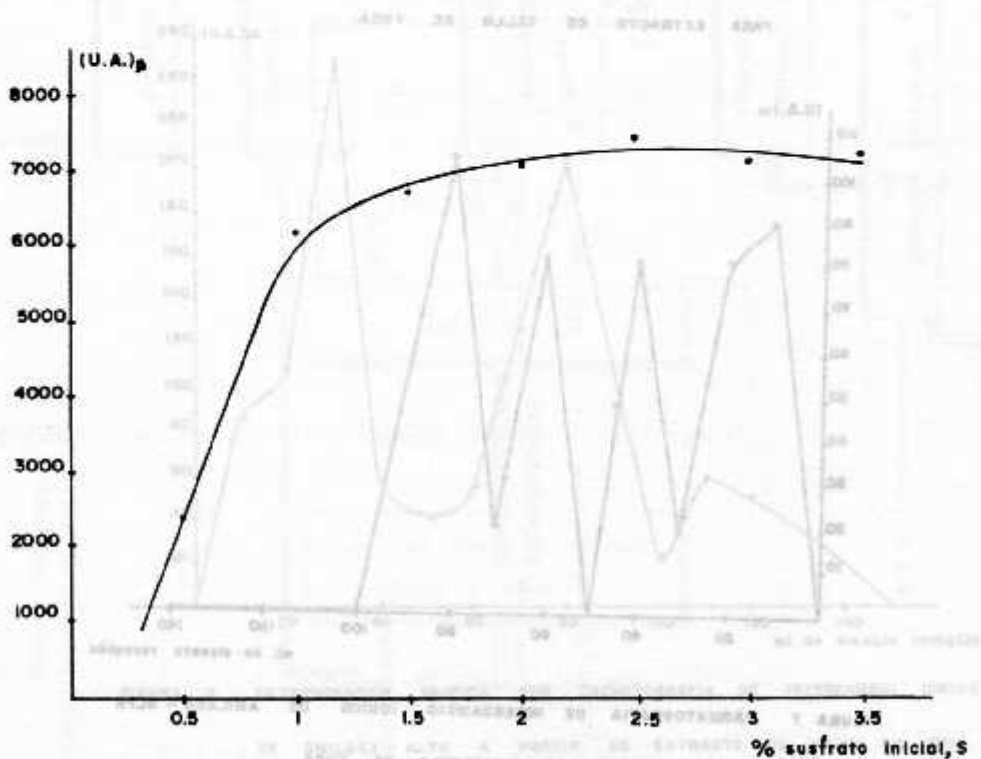


FIGURA 9 COMPORTAMIENTO CINÉTICO PARA SOLUCION PATRON DE AMILASA - BETA.

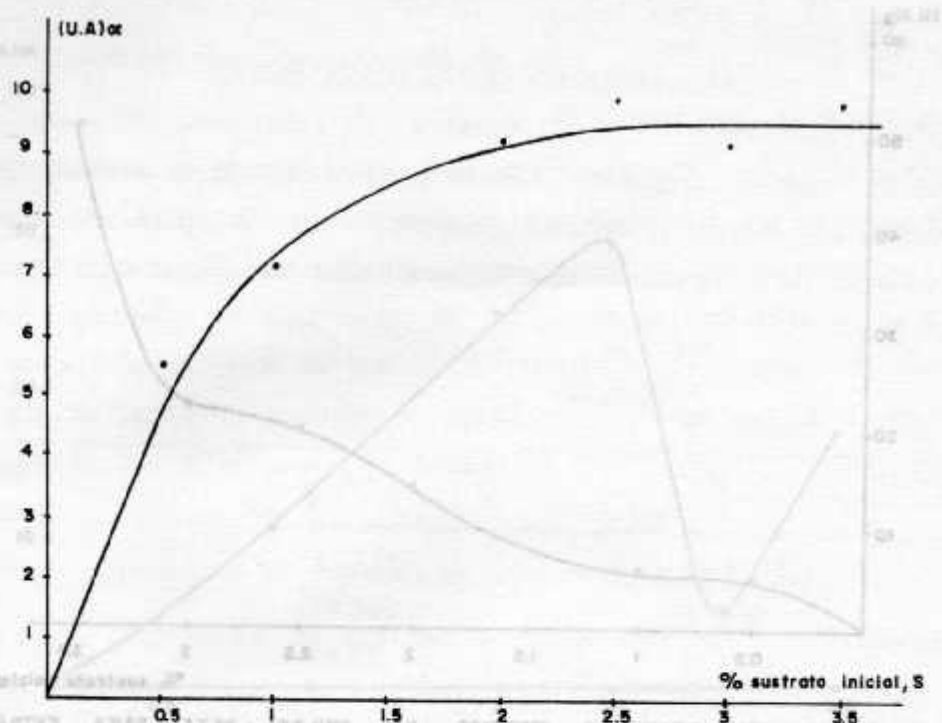


FIGURA 10 COMPORTAMIENTO CINETICO DE AMILASA - ALFA PARA EXTRACTO DE HOJAS

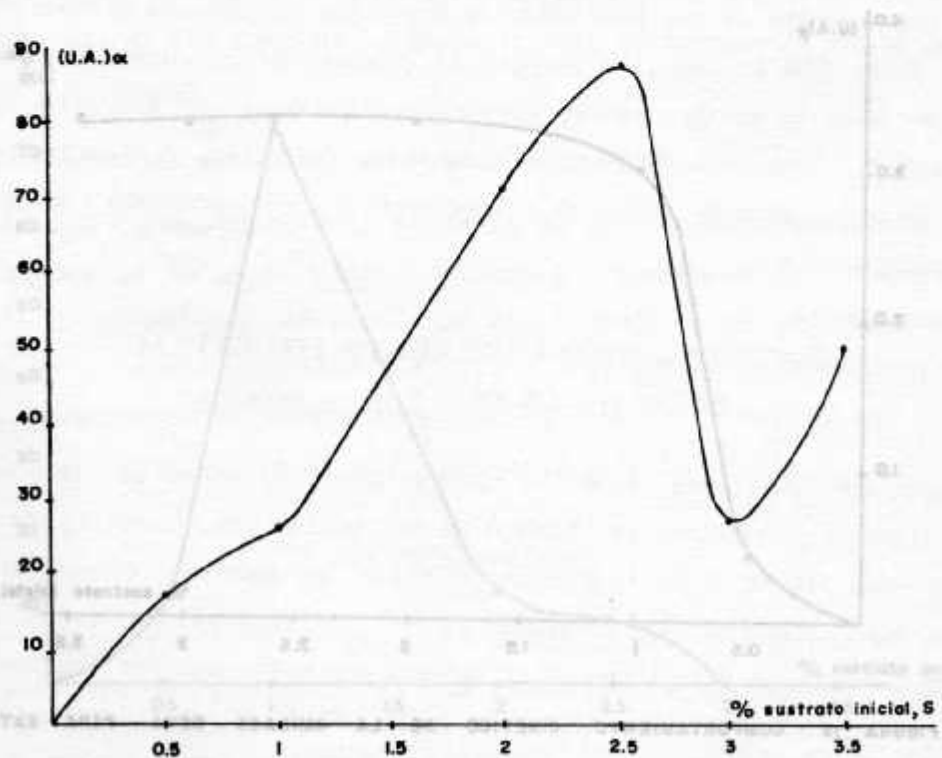


FIGURA 11 COMPORTAMIENTO CINETICO DE AMILASA - ALFA PARA EXTRACTO DE TUBERCULO DIALIZADO

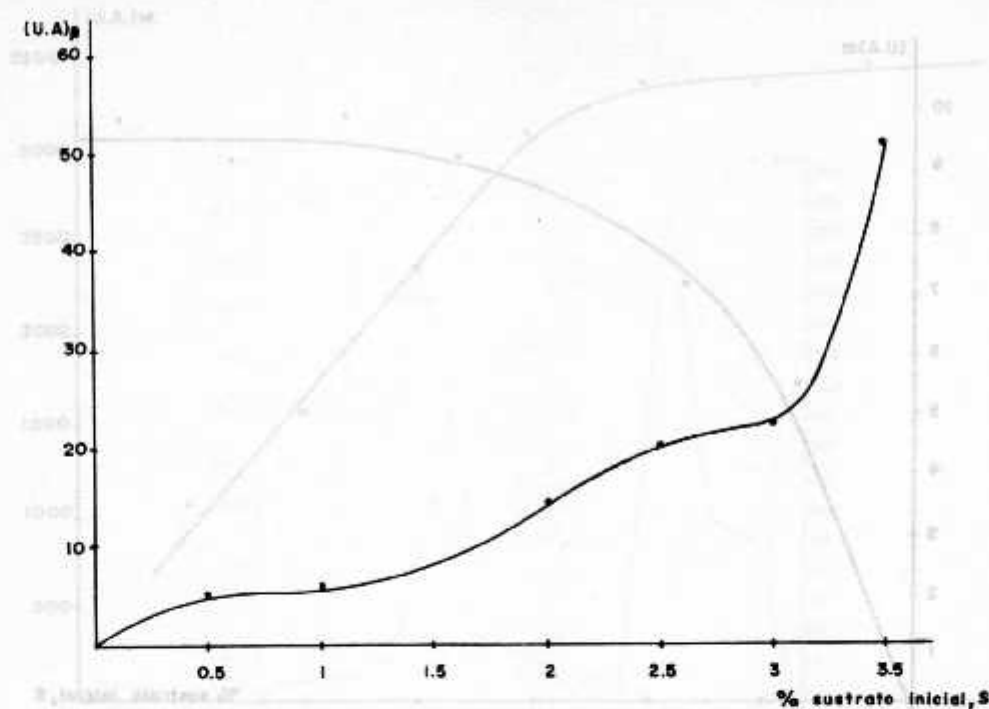


FIGURA 12 COMPORTAMIENTO CINETICO DE AMILASA - BETA PARA EXTRACTO

SALON 20 OTARTES PARA EL DE TUBERCULO DIALIZADO. THREIMATRONOS DE ARDIBY
 FIGURA 13 COMPORTAMIENTO CINETICO PARA EL EXTRACTO DE AMILASA ALFA

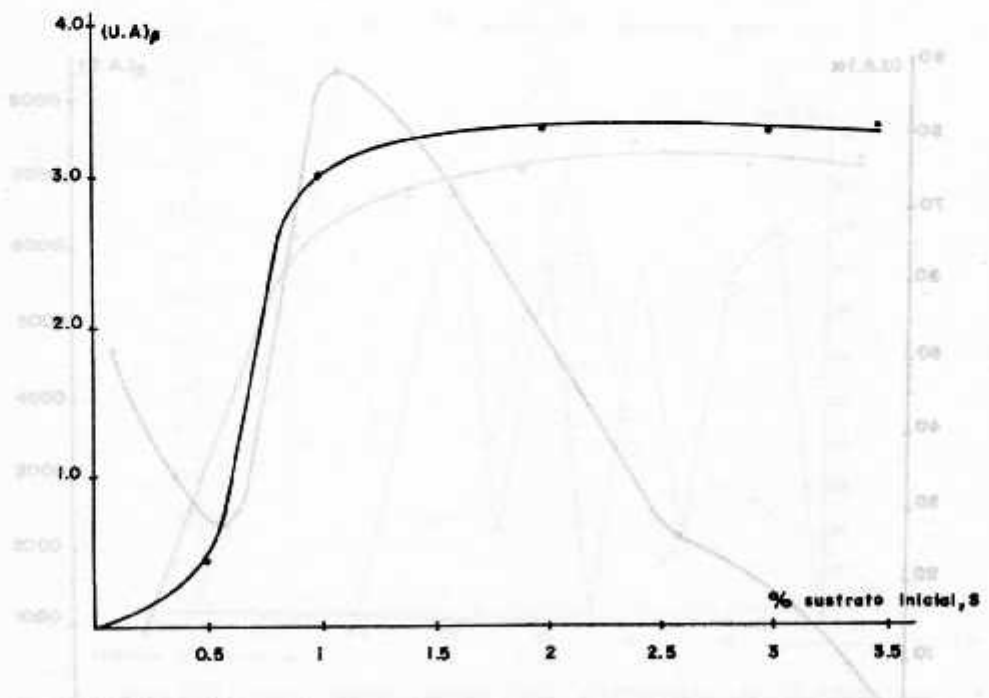


FIGURA 13 COMPORTAMIENTO CINETICO DE LA AMILASA - BETA PARA EXTRACTO

FIGURA 14 COMPO DE HOJAS DIALIZADO. PARA SOLUCION PATRON DE MIELAZA - BETA
 FIGURA 15 COMPORTAMIENTO CINETICO PARA EXTRACTO DE TUBERCULO DIALIZADO DE AMILASA ALFA

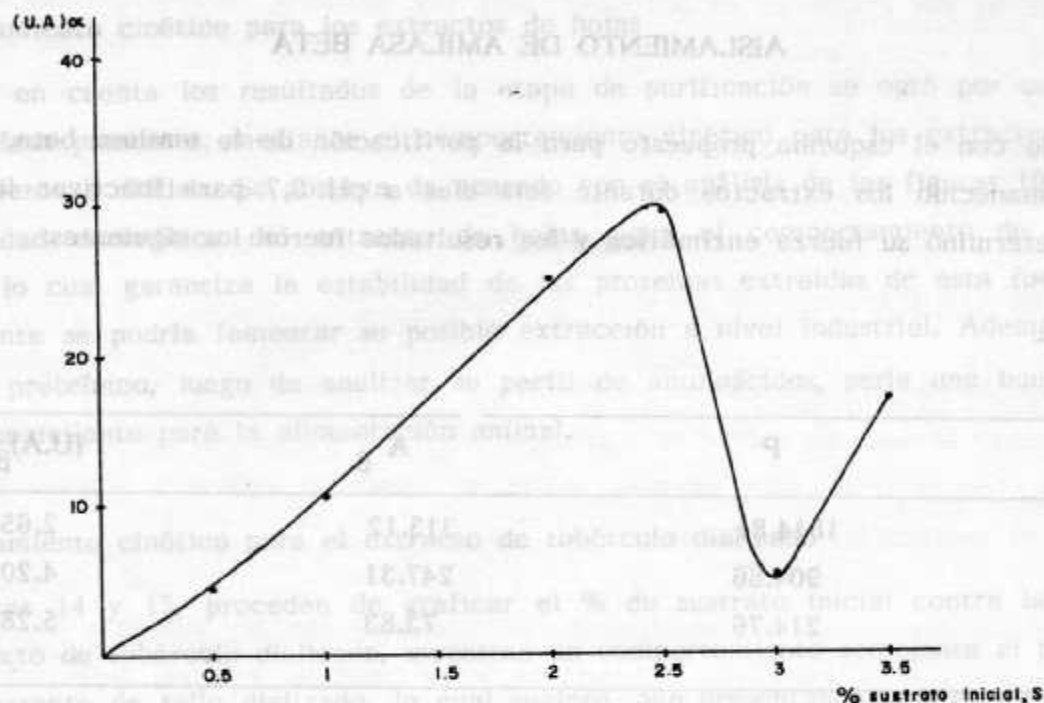


FIGURA 14 COMPORTAMIENTO CINETICO DE LA AMILASA - ALFA PARA EXTRACTO DE TALLO DIALIZADO.

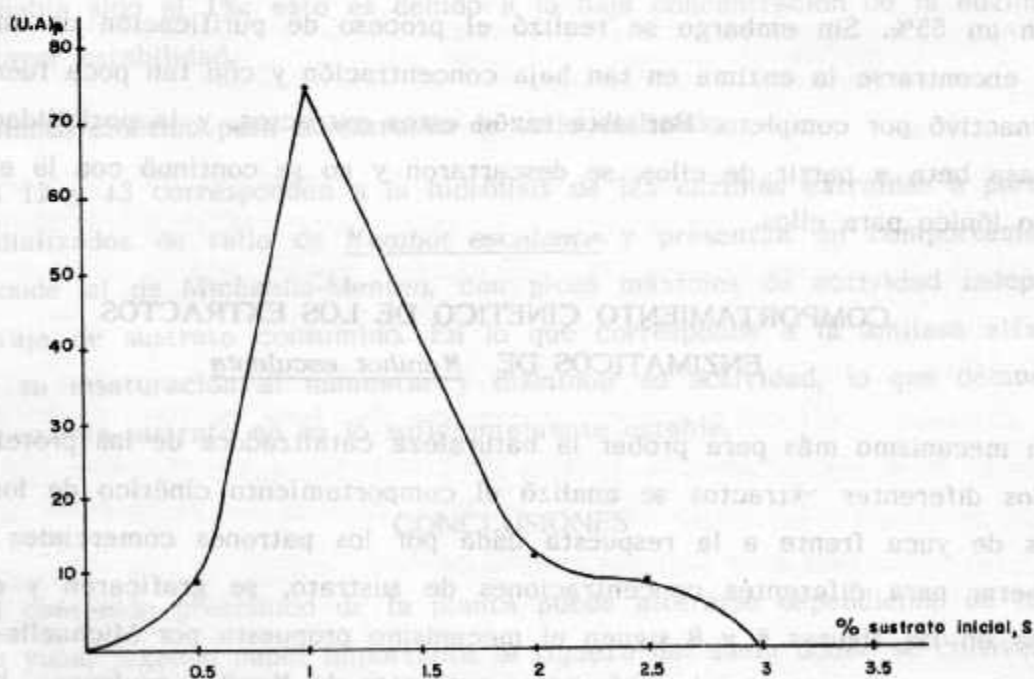


FIGURA 15 COMPORTAMIENTO CINETICO DE LA AMILASA - BETA PARA EXTRACTO DE TALLO DIALIZADO.

AISLAMIENTO DE AMILASA BETA

De acuerdo con el esquema propuesto para la purificación de la amilasa beta, luego de haber permanecido los extractos durante seis días a pH 3,7 para inactivar la amilasa alfa, se determinó su fuerza enzimática y los resultados fueron los siguientes:

TABLA 7.-

Extracto	P	A _β	(U.A) _β
Hojas	1814.81	313.12	2.65
Tallo	904.66	247.31	4.20
Tubérculo	214.76	73.83	5.28

Un análisis comparativo de estos resultados con los datos iniciales demuestran que, en la etapa de inactivación de amilasa alfa, la actividad enzimática disminuyó aproximadamente en un 55%. Sin embargo se realizó el proceso de purificación de amilasa beta, pero por encontrarse la enzima en tan baja concentración y con tan poca fuerza enzimática se inactivó por completo. Por esta razón estos extractos, y la posibilidad de purificar amilasa beta a partir de ellos, se descartaron y no se continuó con la etapa de intercambio iónico para ellos.

COMPORTAMIENTO CINETICO DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS DE Manihot esculenta

Como un mecanismo más para probar la naturaleza catalizadora de las protefmas presentes en los diferentes extractos se analizó el comportamiento cinético de los diferentes extractos de yuca frente a la respuesta dada por los patrones comerciales de amilasa alfa y beta, para diferentes concentraciones de sustrato, se graficaron y como puede apreciarse en las figuras 8 y 9 siguen el mecanismo propuesto por Michaelis-Menten (8). Es de esperarse entonces, que los diferentes extractos de Manihot sculenta, hidrolizados a condiciones idénticas, si efectivamente poseen amilasas deben presentar un comportamiento semejante al de los patrones.

Comportamiento cinético para los extractos de hojas

Teniendo en cuenta los resultados de la etapa de purificación se optó por caracterizar las proteínas presentes, mediante el comportamiento cinético para los extractos que sólo se sometieron a diálisis. Se observa de acuerdo con el análisis de las figuras 10 y 11 que la actividad enzimática del extracto de hojas sigue el comportamiento de Michaelis-Menten, lo cual garantiza la estabilidad de las proteínas extraídas de esta fuente y por consiguiente se podría fomentar su posible extracción a nivel industrial. Además que por su valor proteínico, luego de analizar su perfil de aminoácidos, sería una buena fuente de enriquecimiento para la alimentación animal.

Comportamiento cinético para el extracto de tubérculo dializado

Las figuras 14 y 15, proceden de graficar el % de sustrato inicial contra la actividad del extracto de tubérculo dializado, muestran un comportamiento semejante al presentado por el extracto de tallo dializado, lo cual sugiere, aún presentando valores altos de actividad en lo referente a la amilasa alfa, que también es inestable. Para la amilasa beta se obtuvo su máxima actividad a 3,5% de sustrato inicial, mientras que con el patrón comercial había sido al 1%; esto es debido a la baja concentración de la enzima aunque presenta mayor estabilidad.

Comportamiento cinético para el extracto de tallo dializado

Las figuras 12 y 13 corresponden a la hidrólisis de las enzimas extraídas a partir de los extractos dializados de tallo de *Manihot esculenta*, y presentan un comportamiento que no corresponde al de Michaelis-Menten, con picos máximos de actividad independientes del porcentaje de sustrato consumido. En lo que corresponde a la amilasa alfa se nota claramente su insaturación al aumentar y disminuir su actividad, lo que demuestra que la relación enzima-sustrato no es lo suficientemente estable.

CONCLUSIONES

- El contenido proteínico de la planta puede alterarse dependiendo de la variedad de yuca; jugando papel importante la riqueza del suelo donde se cultive.
- El proceso de diálisis continúa, realizada con el equipo construido a nivel de laboratorio, dio excelentes resultados para todos los extractos, con un tiempo promedio de ocho horas.

- Como el ión calcio es un activador para las amilasas, la operación de diálisis se realizó contra solución de acetato de calcio al 0.2%.
- El coeficiente de transferencia de masa, de acuerdo con el modelo matemático propuesto, para la operación de diálisis fue: 0.488037 m/s, el inverso de este valor es la resistencia a la transferencia, la cual indica también, indirectamente, el grado de permeabilidad de la membrana utilizada.
- Se establecieron esquemas de extracción y purificación de amilasas alfa y beta, y aunque la yuca no ofrece la posibilidad de ser explotada comercialmente, como fuente de enzimas, este esquema puede ser empleado para otro vegetal que posea un contenido amilásico alto.
- La cromatografía de intercambio iónico realizada con los patrones de amilasas demostró que la Amberlita utilizada no logra mantener el nivel de actividad enzimática, o sea que no concentra la enzima (llega es a producir un fraccionamiento de la misma).
- En cuanto a la cromatografía de intercambio iónico realizada sobre los extractos de yuca se observó: el comportamiento en los extractos de hojas y tallo fue muy similar, en ellos la Amberlita logró fraccionar dos tipos de amilasas alfa, por el contrario con el extracto de tubérculo, aunque se registraron cuatro picos, la estabilidad fue menor que en los casos anteriores; lo que implica que entre mayor sea el fraccionamiento del extracto menor será el potencial enzimático obtenido con esta resina.
- El disminuir el pH del extracto, durante seis días para inactivar la amilasa alfa, cuando se desea purificar la amilasa beta trajo como consecuencia una disminución de la actividad enzimática en un 55%; pérdida que es bastante grande por lo cual no es recomendable este procedimiento.
- Debido a su poca fuerza enzimática, y a las mínimas cantidades de amilasa beta, los extractos vegetales se inactivaron por completo durante el proceso de purificación, es de esperarse entonces que el esquema propuesto de mejores resultados con un sustrato vegetal más rico en amilasa beta.

- El comportamiento cinético de los extractos, frente a la respuesta obtenida con los patrones, sirvió como un mecanismo más para probar la naturaleza amilásica de los diferentes extractos. Los ensayos de este tipo, realizados con los patrones confirmaron el modelo Michaelis-Menten para este tipo de enzimas.

REFERENCIAS

1. ALEXANDER, P. and BLOCK, R. The separation and isolation of proteins. New York; Pergamon Press, 1960.
2. ABBOT, D. y ANDREWS, R.S. Introducción a la cromatografía. Versión española de Miguel Fernández Braña. Madrid, Alhambra.
3. BARAJAS, C., ESCALANTE, H. y FLOREZ, J. Obtención del extracto enzimático de yuca para la producción de alcohol por hidrólisis. Bucaramanga, Proyecto de Grado, 1982.
4. BAUDI, Salvador. Química de Alimentos. Alhambra, México, 1981.
5. BECKORD, L.D.; KNEEN, E. and LEWIS, K.H. Bacterial Amylases. Production on Wheat bran. Industrial and Engineering Chemistry. vol. 37, No. 7, 1945.
6. BERL, E. y D'AMS, J. Métodos de Análisis Químico Industrial. Tomo I, Labor, Barcelona, 1946.
7. BOYER, P.D. and Col. The Enzymes, New York. Vol. IV. ACADEMIC PRESS, 1960.
8. Bruchmann E.E. "Bioquímica técnica". Acribia. Zaragoza, 1980.
9. COLOWICK, S.P. and KAPLAN, N.O. Methods in Enzymology. New York: Academic Press, Vol. I, 1955.
10. HAGBER, S.A. Rapid method for determining Alpha-Amylase Activity. Cereal Chemistry, 37, 1960.
11. KRUGER, J.E., TKACHUK, R. Wheat Alpha-Amylase I. Isolation. Cereal Chemistry, 46, 1969.
12. MacGREGOR y Col. Separations of amylase enzymes from barnely malt by ion-exchange Chromatography. Cereal Chemistry, 48, 1971.
13. TIPPLES, K.H. and TKACHUK, R. Wheat Beta-amylase I. Isolation. Cereal Chemistry, 42, 1965.
14. MICHAELS, A.S. New separations technique for the CPI. Chemical Engineering Progress. Vol. 64, 1968.
15. PEREZ, E.A. Plantas útiles de Colombia. Contraloría General de la República, Imp.

Nacional. Bogotá, 1947.

16. PERRY, H.R., CHILTON, C.H. Manual del Ingeniero Químico. 5a. ed. McGraw-Hill Latinoamericana S.A. Bogotá, 1982.
17. RAFOLS, W. Aprovechamiento Industrial de los recursos agrícolas. Barcelona: Salvat Editores S.A., 1964.
18. TAUBER, H. Chemistry and Technology of Enzymes. New York: Wiley and Sons, 1959.
19. The Dow Chemical Company, DOWEX; Ion Exchange, Michigan.
20. WHITAKER, J.R. Principles of Enzymology for the food Sciences, New York: Marcel Dekker, Inc.
21. WINGARD Jr. L.B.; BERENZIN, L.V. and KIYOSOV, A.A. Enzymes. Engineering-Future directions. New York and London: Plenum Press, 1980.
22. LANE and RIGGLE. Chemical Engineering Progress, 55 Symp. ser. 24, 1959.
23. TOWINER. Difussion and Membrane Tecnology. Reinhold, New York, 1962.