

II.- ANTECEDENTES Y FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA

2.1. GENERALIDADES.-

Las amilasas son enzimas que degradan el almidón y tienen numerosas aplicaciones biotecnológicas, un ejemplo de ello es la producción de jarabes, que contienen oligosacáridos como maltosa y glucosa, la composición precisa de los productos finales pueden ser controlados en los procesos fermentativos (Palmer, 1975). La degradación enzimática del almidón por acción de la amilasa a escala industrial, ha sido practicada por muchos años y ha reemplazado considerablemente los procesos tradicionales de catálisis ácida (Barfoed, 1976. Underkofler, y col. 1965). En USA, cerca del 75% de los jarabes y dextrosa sólida son ahora producidos por procesos enzimáticos, es decir una nueva tecnología se ha acentuado en el área de la degradación del almidón por efecto de las amilasas, y entre ellas se tiene ha α -amilasa, β -amilasa, amiloglucosidasa y pulunanasa principalmente, que son producidas por bacterias y hongos. Estas enzimas actúan sobre el almidón hidrolizando enlaces glicosídicos α -(1,4) y/o α -(1,6). Si bien un producto comercial está integrado por una mezcla de enzimas diferentes, los dos grupos de enzimas amilolíticas más importantes están representados por la α -amilasa y β -amilasa.

2.2. DISTRIBUCIÓN Y MODO DE ACCIÓN DE LA α -AMILASA.-

La α -amilasa (α -1,4-D-glucan glucanohidrolasa EC 3.2.1.1, endoamilasa), esta distribuido ampliamente en los microorganismos (*B. acidocaldarius*, *B. amyloliquefaciens*, *B. caldolyticus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. subtilis var. amilosachariticus*, *Bacillus. sp.*, *Bacillus ssp.(alkalophilico)*, *Bacteroides amylophilus*, *Clostridium acetobulicum*, *Lactobacillus amylophilus*, *Micrococcus halobtus*), que hidrolizan enlaces α -1,4 – glicosídicos de la amilosa, amilopectina y glicógeno, pero los enlaces α -1,6

glicosídicos de la cadena ramificada de los polímeros del almidón no son atacados. Las propiedades y mecanismos de acción de las α -amilasas dependen del origen de las enzimas, todas ellas son endo enzimas. La hidrólisis de la amilosa por α -amilasa causa una conversión en glucosa, maltosa, maltotriosa y sobre todo α -dextrinas inicialmente, seguido de una segunda reacción de la maltotriosa que es un sustrato pobre. (Walker y Whelan. 1960). La hidrólisis de los enlaces glicosídicos α -(1,4) entre las ramificaciones α -(1,6) de la amilopectina por la α -amilasa, también rinde glucosa y maltosa además de una serie de α -dextrina límite (que es un núcleo grande y muy ramificado como producto final de la acción exhaustiva de la amilasa), lo que conduce a una licuefacción del almidón después de una rápida gelatinización, por lo que a la α -amilasa se le conoce como enzima “licuante”; éstas dextrinas de cuatro o más residuos de glucosa contienen todos los enlaces α -(1,6) glicosídicos de la estructura original. Con la amilopectina o glucógeno, en la segunda etapa de la degradación del almidón por la α -amilasa, involucra baja hidrólisis de maltotriosa, así como baja hidrólisis de enlaces específicos cerca de los puntos de ramificación de las α -dextrina límite. Diferentes α -amilasas producen diferentes α -dextrina límite (Whelan, 1960; Umeki y Yamamoto 1975; Richard, 1989). Además de una sola ramificación de α -dextrina límite, es altamente probable que algunas α -amilasas producen múltiples ramificaciones de α -dextrina límite (French 1960; Roberts y Whelan 1960). La isomaltosa no es formada en estas reacciones porque los enlaces α -(1,6) son resistentes a la α -amilasas y ellas les confieren alguna estabilidad a los enlaces α -(1,4) cerca de los puntos de ramificación, la formación del complejo enzima-sustrato parece ser restringida por la presencia de éstos enlaces α -(1,6). (Manners y Marshall, 1971).

2.3. DISTRIBUCIÓN Y OCURRENCIA DE LA β -AMILASA.-

Otra de las enzimas importante del complejo enzimático de las amilasas es la β -amilasa. Según Meyer, y col. (1953); Rowe y Weill, (1962). La enzima la β -

amilasa (EC 3.2.1.2, α -1,4-D-glucan maltohidrolasa, amilasa sacarogénica), esta presente ampliamente en plantas y microorganismos tales como bacterias y levaduras, ésta enzima actúa sobre los extremos no reductores de la amilosa, amilopectina o glicógeno; hidrolizando enlaces glicosídicos alternantes, produciendo las formas β -anoméricas de maltosa. La producción de las formas β -anoméricas de maltosa se da por la inversión de la configuración alrededor de la posición del C₁ de α a β , este cambio configuracional es la razón por la que a ésta enzima se le denomina β , (Reed, 1975). La β -amilasa, es incapaz de pasar los enlaces α -1,6 glicosídicos de la amilopectina y el glicógeno. La degradación de estos polímeros ramificados es sin embargo incompleta. La acción de la β -amilasa sobre la amilopectina resulta en la conversión de 50 – 60% de maltosa y formación de β -dextrina límite.

Puesto que la enzima hidroliza enlaces glicosídicos alternados, el producto de esta reacción es maltosa cuando la enzima actúa en una cadena molecular lineal con un igual número de residuos de glucosa; cuando la enzima actúa en una cadena consistente en un desigual número de residuos, parte glucosa y maltotriosa son también encontrados en los productos finales. La ruptura de la maltotriosa dando productos glucosa y maltosa, sucede a una velocidad más baja que la β -amilosis inicial, y, requiere la presencia de una alta concentración de enzima. (Reed, 1975).

2.4. LIQUEFACCIÓN Y SACARIFICACIÓN DE LA α -AMILASA .-

La α -amilasa liquefactante produce solo β -dextrina límite ramificada, ellos consisten de no mas de nueve unidades de glucosa (Umeki y Yamamoto, 1977), Esta dextrina es una mezcla de seis sencillas ramificaciones de heptosas con diferentes puntos ramificados, pero todas ellas contienen unidades de maltosilmaltotriosa en su estructura, ellas difieren solo en la manera de unión por los enlaces α -1,4 glicosídicos enlazados por dos unidades de glucosa o un residuo de maltosa al núcleo de la dextrina. La α -amilasa sacarificante, produce doble

dextrina límite ramificada, todas ellas contienen residuos de α -glucosylmaltotriosa en el extremo reductor y un residuo de isomaltosyl en el extremo no reductor (Umeki y Yamamoto, 1975). Tanto las amilasas liquefactantes y sacarificantes, se distinguen por su mecanismo sobre la degradación del almidón, porque la sacarificación de la α -amilasa produce un incremento en el poder reductor alrededor de dos veces que el de la enzima liquefactante.

2.5. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA α -AMILASA

Las α -amilasas son generalmente estable a pH 5.5 – 8.0 en presencia de un complemento de calcio, la actividad óptima de las α -amilasas normalmente ocurre entre pH 4.8 a 6.5 (Maning y Campbell, 1961), pero hay diferencias en las formas de las curvas de actividad de pH de las diferentes enzimas de amilasas y también en los valores de pH óptimo (Tabla N° 1). Sin embargo, (Fogarty y Kelly 1979) las clasifica según el pH a la que actúan en amilasas alcalinas y ácidas; las amilasas alcalinas tienen un pH óptimo entre 8.0 y 10.5, que se usan en la fabricación de detergentes principalmente; las amilasas ácidas actúan en un rango de pH de 3.5 a 5.0 cuya existencia indica una mejora potencial en los procesos de degradación del almidón.

Según la temperatura a la que actúan, las amilasas se pueden clasificar en amilasas termoestables y termolábiles; las enzimas termoestables son aquellas que actúan sin perder su actividad en un rango de 60 a 110 °C y la mayoría de ellas son de origen bacteriano (Tabla N° 1); mientras que las enzimas termolábiles, son aquellas que actúan hasta 55 °C sin perder su actividad, generalmente varían entre los 20 y 55 °C y son de origen fúngico principalmente (Tabla N° 2), (Wiseman, 1986). La mayoría de las enzimas purificadas pierden actividad rápidamente encima de los 50 °C pero ésta inactivación puede ser retardada por la presencia de calcio, las α -amilasas no cuentan con coenzimas pero ellas son calcio metalo enzimas (Fischer y Stein. 1960); las amilasas tienen por lo menos un átomo del ión calcio por molécula de enzima. La fuerza de los enlaces de éste

metal a las proteínas es dependiente de la fuente de la enzima, además las α -amilasas requieren de éste metal para la actividad catalítica, con la presencia de calcio son completamente resistentes a los extremos de temperatura, pH, tratamiento con urea o exposición a proteasas como pepsina, tripsina, subtilisina, y papaina (Stein y Fischer, 1958. Yamamoto, 1958). La α -amilasa de *Bacillus subtilis* requiere por lo menos cuatro átomo-gramos de calcio por mol de enzima (Arai y col. 1969). La α -amilasa de *Aspergillus orizae* necesita 10 atomo-gramos de calcio por mol de enzima y nueve de estos parece ser que se pierden y pueden ser removidos sin la actividad catalítica alternante. (Fujita-Ikeda y Isemura, 1960). La remoción del contenido de calcio por EDTA resulta en pérdida de actividad que puede ser restaurado por adición de calcio (Kato, y col. (1967). Sin embargo, De Souza y col. (2000), sostienen que la adición de calcio 10 mM, peptona 1%; extracto de levadura 0.5% a un medio mineral acorta el periodo de latencia mejorando el crecimiento de las células y la síntesis de α -amilasa de *Bacillus sp.*

Las α -amilasas, en su mayoría tienen pesos moleculares alrededor de 50 000 (Tabla N° 1), una α -amilasa de *B. subtilis* capaz de sufrir transformación de dímero a monómero fue reportado por (Menzi y col. 1975), el dímero tuvo un peso molecular de 100 000 y tratado con agentes quelantes se produjo la forma monomérica. La dimerización bajo la influencia de zinc parece ser peculiar para la enzima α -amilasa de *B. subtilis*, los pesos moleculares del monómero y dímero de la α -amilasa de *B. subtilis* han sido determinados por diferentes trabajos existiendo resultados discordantes, dilucidándose esta controversia con el trabajo de (Detera y Friedberg, 1979), tratando a la α -amilasa de *B. subtilis* con bromuro de cianuro y estableciéndose una peso molecular de 48 000 para toda la enzima; mientras que para los dímeros se estableció un peso molecular de 24 000 según (Connellan y Shaw 1970; Michell y col. 1973).

2.6. EL ALMIDÓN COMO SUBSTRATO.-

El almidón es un polisacárido de reserva de los vegetales que está distribuido tanto en las raíces, tallos y hojas, se encuentran más abundantemente en las semillas de los cereales y en los tubérculos como las patatas, camote, yuca, etc. (Tabla N° 3), (Laguna y Peña, 1979). Los almidones están presentes en los tejidos vegetales en forma de gránulos intracelulares compactos. La estructura granular de los almidones puede ser explicada en términos de la fuerza de atracción entre las largas moléculas de carbohidratos. Dentro de los gránulos se dispone radialmente en capas concéntricas, una mezcla de moléculas lineales y ramificadas y cuando hay asociaciones paralelas entre éstas, se mantienen juntas por puentes de hidrógeno de lo que resultan regiones cristalinas o micelas, lo cual causa que el gránulo sea birrefringente; y evita su disolución en el agua fría por la formación de una malla molecular que mantiene juntos los gránulos. Estas fuerzas asociadas entre las moléculas pueden ser vencidas si se aplica una energía suficiente. (Custer, 1970).

Los gránulos de almidón suelen hincharse progresivamente y los polímeros más cortos se disuelven cuando se calientan en agua a 60 °C aproximadamente y a temperaturas más altas los gránulos se gelatinizan y pierden su poder de birrefringencia, se desintegra y forma una pasta según el origen y la concentración del almidón (Morgan, 1940; Muller, 1942). El rompimiento de la estructura del almidón por calentamiento en agua se asume en tres etapas. En la primera, se produce una absorción del agua en forma lenta y reversible a la vez que se produce un ligero hinchamiento de los gránulos, la viscosidad de la suspensión no aumenta notoriamente y el gránulo retiene su apariencia y birrefringencia. La segunda etapa, se basa en el hinchamiento notorio del gránulo incrementándose rápidamente la viscosidad de la suspensión, los gránulos se alteran, varían en su aspecto interno y pierden su estructura y birrefringencia. Durante la tercera etapa de hinchamiento, los gránulos se transforman en sacos deformados (Kerr, 1950).



La insolubilización espontánea del almidón en soluciones acuosas es denominada retrogradación; esta característica es atribuible a las tendencias de los polímeros del almidón a enlazar hidrógenos. La fracción de amilosa se retrograda rápidamente debido a su habilidad para formar enlaces de hidrógeno intermoleculares; las fracciones ramificadas muestran mucho menos tendencia a formar enlaces de hidrógeno y retrogradar. Esta reacción es importante en el almacenamiento de los geles de almidón y en el tiempo de vida de los alimentos cocidos en horno (Reed, 1975). Frecuentemente cuando una solución de almidón esta muy concentrada, se observa la formación de un gel a manera de un precipitado, este mismo fenómeno se presenta cuando se enfrían rápidamente o dejan en reposo las soluciones menos concentradas, denominándose a éste fenómeno como “retrogradación”.

El almidón en su forma nativa se encuentra formado por dos constituyentes la α -amilosa y la amilopectina. La α -amilosa está constituida por cadenas largas no ramificadas de D-glucosa que se hallan unidas mediante enlaces α -(1,4), las cadenas son polidispersas y varían en peso molecular, no es verdaderamente soluble en el agua pero forma micelas hidratadas, que le confieren un enrollamiento helicoidal. La amilopectina está muy ramificada, la longitud media de las ramificaciones es de 24 a 30 residuos de glucosa que varían según la especie. Los enlaces glicosídicos son α -(1,4), pero en los puntos de ramificación son enlaces α -(1,6). La amilopectina produce disoluciones coloidales o micelas que dan una coloración rojo violácea con el yodo su peso molecular puede llegar hasta 100 millones. Lehninger, (1985).

TABLA N° 1

PROPIEDADES DE ALGUNAS α -AMILASA BACTERIANAS

MICROORGANISMO	PH OPTIMO	TEMPERATURA OPTIMA (°C)	PESO MOLECULAR (Kd)
<i>B. acidocaldarius</i>	3.5	75	6.8X10 ⁴
<i>B. amiloliquefaciens</i>	5.9	65	4.9X10 ⁴
<i>B. caldarius</i>	5.4	70	--
<i>B. coagulans</i>	7.5-8.5	85	--
<i>B. licheniformis</i>	5.0-8.0	76	2.25X10 ⁴
	9.5	91	--
	6.-7.0	85	2.35X10 ⁴
<i>B. stearothermophilus</i>	7.0-9.0	70-90	6.26X10 ⁴
	5.4-6.1	70	5.3X10 ⁴
	4.5-6.5	65-73	4.810 ⁴
<i>B. sp. NRRI. B3881</i>	9.2	50	--
<i>B. sp</i>	5.0-6.0	70	--
<i>B. subtilis</i>	5.3-6.4	50	4.7X10 ⁴ -1X10 ⁴
<i>B. subtilis NRRI.B3411</i>	5.8	63	--
	6.0	60	4.810 ⁴
<i>Thermophilo V-2</i>	6.0-7.0	70	5X10 ⁴
<i>Acinetobacter sp 1</i>	7.0	50-55	5.5X10 ⁴
11	7.0	50-55	6.5X10 ⁴
<i>Bacteroides amilophilus</i>	6.3	4.3	9.2X10 ⁴
<i>Micrococcus halophilus</i>	6.0-7.0	50-55	8.9X10 ⁴
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	5.0-6.0	50-55	4.8X10 ⁴
<i>Streptomyces aucofaciens</i>	4.6-5.3	40	4X10 ⁴
<i>Streptomyces praccox</i>	6.0-7.0	40	--
<i>Thermoactinomyces vulgans</i>	5.0	70	--
<i>Thermoactinomyces curvata</i>	5.5-6.0	65	6.2X10 ⁴
<i>Thermomonospora viridis</i>	6.5	55	--

Fuente: Fogarty, (1973). Microbial amylases

TABLA N° 2

PROPIEDADES DE ALGUNAS α -AMILASA FUNGICAS

MICROORGANISMO	PH OPTIMO	TEMPERATURA OPTIMA (°C)	PESO MOLECULAR (Kd)
<i>Aspergillus niger</i>	5.0-.6.0	60	--
<i>Aspergillus orizae</i>	5.5-5.9	40	5.26X10 ⁴
<i>Mucor pusillos</i>	3.5-4.0	65-70	5.1X10 ⁴ - 4.8X10 ⁴
<i>Paccilomyces subglobosum</i>	4.0	38	--
<i>Lipomyces starkeyi</i>	3.0-4.0	50-60	--
<i>Sacharomyces castellii</i>	6.0	60	4X10 ⁴
<i>Torulopsis ingeniosa</i>	5.5	50	--
<i>Endomicopsis fibuliger</i>	5.5	45	--

Fuente: Fogarty, (1973). Microbial amylases

TABLA N° 3

COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DE PRODUCTOS VEGETALES

PRODUCTO	ALMID	PROT.	LÍPIDOS	FIBRA	CENIZA	AGUA
<u>g% en E.S.</u>						
Patatas	84	8	0.5	3.0	4.0	78
Tapioca	95	1	0.5	3.0	1.5	12
Trigo	75	12	3.0	3.0	2.0	12
Arroz	75	8	3.0	3.0	2.0	12
Sorgo	75	12	3.0	3.0	2.0	12
Maíz	75	12	3.0	3.0	2.0	12

g% en extracto seco

Gilbolt, (1968), Structure de L'almidon dans "Progres en chimie agricole et Alimentaire.

TABLA N° 4

COMPOSICIÓN DE AMILOSA Y AMILOPECTINA EN ALMIDONES
NATURALES

PRODUCTO	AMILOSA (%)	AMILOPECTINA(%)
Patatas	23	77
Tapioca	20	80
Trigo	20	80
Arroz	15 – 35	63 – 85
Sorgo	25	75
Maíz	25	75

Gilbolt, (1968), Structure de L'almidon dans "Progres en chimie agricole et Alimentaire.

TABLA N° 5

COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DE ALMIDÓN DE YUCA

VARIABLES	MEDIA %	DESVIACION	CV (%)
<u>% DE BASE SECA</u>			
Almidón	83.08	0.354	0.43
Fibra	11.78	0.359	3.05
Azucares totales	1.10	0.017	1.57
Cenizas	1.31	0.015	1.16
Proteínas	1.59	0.060	3.77
Lípidos	0.47	0.040	8.54

CEREDA, (1996). Caracterização, usos e tratamentos de residuos da industrialização da mandioca. Botucatu: Centro de Raízes Tropicais.

2.6. ANTECEDENTES.-

Kwan, H.S. y col. (1993). Determinaron la producción de β -amilasa por *Bacillus circulans* aisladas de suelos de Hong-Hong, en la fermentación emplearon como sustrato almidón soluble, fosfato de amonio, extracto de levadura, citrato de sodio, sulfato de magnesio y cloruro de calcio, a pH 7.0 y una temperatura de 45 °C obteniéndose una máxima actividad específica de β -amilasa de 32,2 U/mg. de proteína después de 36 horas. Los iones calcio 0.5 mM, Bario 1mM y Mn 1mM, estimulan la producción de β -amilasa de *B. Circulans* S31.

Achi, O.K, y col. (1992). Reportan el estudio de producción de amilasa por *Bacillus alvei*, encontrando una alta actividad de amilasa de 868 U/mL utilizando almidón de yuca en un medio basal compuesto por fosfato de potasio, sulfato de magnesio, tryptona, cloruro de calcio, extracto de levadura, citrato de sodio y harina de soya a pH 6.8 y temperatura de 40 °C, en que demuestran que la fuente de nitrógeno de origen orgánico como el extracto de levadura, harina de soya, incrementa el crecimiento celular, mientras que los de origen inorgánico (sulfato de amonio, cloruro de amonio) decrecen el crecimiento de las células, mientras que la adición de 0.1 % de citrato de sodio en el medio basal estimula la síntesis de amilasa, esto puede ser por que el calcio es esencial para la producción de amilasa o su estabilización en el que el citrato ayuda a mantener el calcio en solución.

Mai, N.T.,y col. (1992). Evaluaron 25 bacterias termófilas productoras de amilasa, asiladas de suelos Vietnamitas, de las cuales se identificaron a *Bacillus stearothersophilos* UQM 2104 y *Bacillus licheniformis* UQM378 T2 y T5, ambas productoras de amilasa, la actividad encontrada fue de 19, 11, 15 y 13 U/mL respectivamente, en que usaron almidón de yuca como fuente de carbono en un medio basal compuesto por extracto de carne, extracto de levadura, fosfato de potasio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio y cloruro de sodio a pH 7.4 y temperatura de 55 °C., y la mejor fuente de nitrógeno encontrada en la fermentación fue extracto de levadura, seguido de sulfato de amonio.

Rani, y col. (1994). Reportan el estudio de producción de β -amilasa de *Bacillus megaterium* y posterior sacarificación de almidón crudo y gelatinizado sobre diferentes sustratos agrícolas. Para la producción de β -amilasa se ha empleado un medio basal conteniendo peptona, sulfato de amonio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio y como fuente de carbono almidón de yuca, encontrando una actividad de 14 U/mL.

Goyal, y Sidhu, (1995). Reportan la producción y estabilidad de una α -amilasa termoestable a 70°C de *Bacillus* sp Mk 716, encontrando una actividad de 4800 U/ml. empleando un medio de crecimiento M9 propuesto por Maniatis y col. (1989).

Okolo, y col. (1993). Realizaron estudios sobre el rendimiento de la actividad de amilasa de *Thermoactinomyces thalophilus* F13 sobre diferentes sustratos agrícolas (arroz, yuca, cebada, coco, sorgo, papa y gelatinizado de papa, encontrando una de las mayores actividades de la enzima amilasa con 15.7 U/mL. para almidón de yuca en un medio base compuesto por sales.

Niziolek, (1997). Investigó la producción extracelular de beta-amilasa de *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus polymyxa* NCIB 8524, y los máximos rendimientos de la enzima fueron 3.6; 9.3 y 20.4 U/mL respectivamente. En la producción de ésta enzima se empleó un medio semi sintético conteniendo sales inorgánicas, almidón de papa y extracto de soya en vez de peptona y extracto de carne.