

Estandarización del método de Lugol-carbohidrato para la evaluación de la actividad enzimática
de α -amilasa de *Zea mays L.*

María Camila Díaz Quintanilla y Astrid Carolina Gelves Abril

Trabajo de Grado para Optar el Título de Química

Director

Martha Cecilia Daza Espinosa

Dra. en Ciencias - Química

Codirector

William Fernando Hidalgo Bucheli

Dr. en Química Ecológica

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2021

Dedicatoria

A mi madre.

Por su amor, paciencia y apoyo incondicional para alcanzar mis sueños.

A mi abuela.

Por siempre creer en mí y recordarme de todo lo que soy capaz.

A mi compañera.

Por su esfuerzo y dedicación, por confiar en mí y permitirme compartir este camino junto a ella.

A C.C.

Porque sin su motivación y apoyo no lo habría logrado.

María Camila Diaz Quintanilla

A mi madre,

Por ser el pilar de mi vida.

Por confiar y creer en todo lo que he querido ser, siendo mi motivo para seguir cuando he querido caer.

A mi compañera,

Por demostrarme que, a pesar de las adversidades, se puede con todo.

Por su fortaleza, dedicación y compañía constante en todo mi proceso universitario.

Astrid Carolina Gelves Abril

Agradecimientos

Agradecemos en primer lugar, a los directores de la tesis por brindarnos su confianza, a la doctora *Martha Cecilia Daza Espinosa* por la oportunidad de trabajar en este proyecto juntas, además de su apoyo emocional y económico para desarrollarlo; a el doctor *William Hidalgo Bucheli* por acompañarnos y guiarnos en el trayecto.

A la *Universidad Industrial de Santander* por proporcionarnos los recursos y herramientas necesarias para llevar a cabo el proyecto de investigación, por ofrecernos educación de calidad y aportar a nuestras vidas un pensamiento crítico y realista frente a la vida y la realidad social del país.

A *todos nuestros maestros, compañeros y colegas* que formaron parte fundamental en la evolución de este proyecto y en el proceso de cada una como profesional.

Muchas gracias a todos.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. Justificación	15
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo General	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. Marco teórico	19
3.1. Taxonomía y características morfológicas de <i>Zea Mays L.</i>	19
3.2. El almidón	24
3.3. Caracterización de α -amilasa	27
3.3.1. Clasificación y función	27
3.3.2. Estructura	29
3.3.3. Mecanismo catalítico	32
3.3.4. Propiedades de la enzima	37
3.3.5. Cinética enzimática	40
3.4. Prueba de Lugol	45
3.5. Método de Bradford	49
3.6. Método de DNS	51
4. Metodología	52
4.1. Estandarización del método de Lugol	52
4.1.1. Ensayos preliminares	52
4.1.2. Estudio del reactivo de Lugol	53

4.1.3. Curva de calibración del método de Lugol	55
4.1.4. Análisis estadístico.....	56
4.2. Extracción del extracto enzimático de semillas de Zea Mays L.....	57
4.2.1. Montaje y germinación de las semillas.....	57
4.2.2. Obtención del extracto crudo que contenía α -amilasa	58
4.3. Método de Bradford.....	59
4.4. Determinación de la actividad enzimática de α -amilasa.....	61
4.4.1. Efecto de la concentración de enzima.....	61
4.4.2. Efecto del pH	62
4.4.3. Efecto de la temperatura	63
4.4.4. Cinética enzimática.....	64
4.4.5. Determinación de la actividad enzimática por método DNS y método de Lugol	65
5. Resultados y análisis	68
5.1. Estandarización del Método de Lugol	68
5.1.1. Ensayos preliminares	68
5.1.2. Estudio del reactivo de Lugol	71
5.2. Extracción del extracto enzimático de semillas de Zea Mays L.....	79
5.3. Método de Bradford.....	81
5.4. Determinación de la actividad enzimática de α -amilasa de Zea Mays L.....	83
5.4.1. Efecto de la concentración de enzima.....	84
5.4.2. Efecto del pH	85
5.4.3. Efecto de la temperatura	87
5.4.5. Cinética enzimática.....	89

5.4.6. Método DNS	95
6. Conclusiones	98
Referencias Bibliográficas	101
Apéndices.....	111

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Zea Mays L</i>	19
Tabla 2. Constantes cinéticas de α -amilasa de <i>Zea Mays L</i>	40
Tabla 3. Volumen de solución I ₂ :KI para la formación del complejo yodo-almidón.....	53
Tabla 4. Concentración de las soluciones de almidón para la formación del complejo yodo-almidón	53
Tabla 5. Concentración de I ₂ y KI en la solución de I ₂ :KI en relación 1:5	54
Tabla 6. Variación de la concentración de KI en la solución I ₂ :KI	55
Tabla 7. Variación de la concentración de I ₂ en la solución I ₂ :KI.....	55
Tabla 8. Patrones para la curva de calibración del método de Lugol	56
Tabla 9. Curva de calibración del método de Lugol.....	56
Tabla 10. Patrones para la curva de calibración del método de Bradford	60
Tabla 11. Curva de calibración del método de Bradford	60
Tabla 12. Variación de la concentración de α -amilasa en la reacción	61
Tabla 13. Soluciones de almidón 0.1% p/v a diferentes pH	63
Tabla 14. Preparación de muestras para la elaboración de curvas de progreso	65
Tabla 15. Patrones para la curva de calibración del método DNS.....	66
Tabla 16. Curva de calibración del método DNS	66
Tabla 17. Comparación de constantes cinéticas de α -amilasa de <i>Zea Mays L</i>	94
Tabla 18. Actividad enzimática de α -amilasa de <i>Zea Mays L</i> a pH 6 y 80°C.....	98

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Anatomía del grano de maíz.....	22
Figura 2. Etapa de germinación de maíz.....	24
Figura 3. Estructura del almidón.....	27
Figura 4. Estructura terciaria de α -amilasa	30
Figura 5. Visualización detallada de la estructura terciaria de α -amilasa.....	32
Figura 6. Distorsión del sustrato en el mecanismo de acción de α -amilasa	34
Figura 7. Mecanismo catalítico de α -amilasa	36
Figura 8. Curva de progreso de reacciones de orden cero y primer orden	42
Figura 9. Variaciones dependientes del tiempo de una reacción enzimática irreversible	43
Figura 10. Cinética de Michaelis-Menten.....	45
Figura 11. Reacción de yodo molecular (I_2) con yoduro de potasio (KI).....	46
Figura 12. Interacción química asociada al método de Bradford	50
Figura 13. Reacción química asociada al método DNS.....	51
Figura 14. Montaje de germinación para semillas de <i>Zea Mays L</i>	58
Figura 15. Estudio de la variación del volumen de I_2 :KI sobre la absorbancia del complejo yodo-almidón	70
Figura 16. Estudio de la concentración de almidón (% p/v) sobre la absorbancia del complejo yodo-almidón	71
Figura 17. Efecto de la concentración de I_2 :KI sobre la absorbancia del complejo yodo-almidón	73
Figura 18. Efecto de la variación de KI (en I_2 :KI) sobre la absorbancia del complejo yodo-almidón	75

Figura 19. Efecto de la variación de I_2 (en $I_2:KI$) sobre la absorbancia del complejo yodo-almidón	76
Figura 20. Curvas de calibración para las soluciones $I_2:KI$	78
Figura 21. Semillas de maíz al cuatro día de germinación	80
Figura 22. Curva de calibración del método de Bradford con albúmina sérica bovina.....	81
Figura 23. Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática de α -amilasa de Zea Mays L	84
Figura 24. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de α -amilasa de Zea Mays L.....	86
Figura 25. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de α -amilasa de Zea Mays L	88
Figura 26. Efecto de la concentración de almidón (% p/v) sobre la cinética enzimática de α -amilasa de Zea Mays L a pH 6 y 80°C	90
Figura 27. Determinación de la velocidad inicial de la reacción enzimática catalizada por α -amilasa de Zea Mays L	91
Figura 28. Determinación de las constantes cinéticas de la reacción enzimática catalizada por α -amilasa de Zea Mays L	92
Figura 29. Curva de calibración del método DNS con solución de glucosa.....	95

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Datos de las soluciones I ₂ :KI elaboradas en ensayos preliminares	111
Apéndice B. Información del proceso de germinación de las semillas de <i>Zea Mays L.</i>	111
Apéndice C. Análisis estadístico para la variación de la concentración de las soluciones I ₂ :KI	113
Apéndice D. Análisis estadístico para la variación de KI en la solución I ₂ :KI	113
Apéndice E. Análisis estadístico para la variación de I ₂ en la solución I ₂ :KI	114
Apéndice F. Datos obtenidos para las curvas de calibración de las soluciones I ₂ :KI.....	115
Apéndice G. Datos obtenidos para la curva de calibración del método Bradford	116
Apéndice H. Datos obtenidos para la variación de la concentración de enzima	116
Apéndice I. Datos obtenidos para la variación del pH.....	117
Apéndice J. Datos obtenidos para la variación de la temperatura	117
Apéndice K. Datos obtenidos para las curvas de progreso	118
Apéndice L. Datos obtenidos para la curva de calibración del método DNS.....	118

Resumen

Título: Estandarización del método de Lugol-carbohidrato para la evaluación de la actividad enzimática de α -amilasa de *Zea mays L.**

Autor: María Camila Díaz Quintanilla, Astrid Carolina Gelves Abril **

Palabras Clave: α -amilasa, método de Lugol, almidón, actividad enzimática.

Descripción:

La enzima α -amilasa representa cerca del 25-30% de la producción total de enzimas en el mundo y al igual que el almidón, es ampliamente empleada en industrias de alimentos, papel, textil, de detergentes, entre otras. En este trabajo se llevó a cabo la estandarización del método de Lugol para la determinación de la actividad enzimática de α -amilasa por medio de espectroscopia UV-Vis. Para ello, se realizó el estudio de la preparación del reactivo de Lugol, el complejo yodo-almidón y la linealidad de los mismos; por lo tanto, la curva de calibración se elaboró utilizando 10 μ L del reactivo de Lugol a una concentración de yodo igual a 0.658 M (1,5 %p/v de I_2 y 10%p/v de KI) y 2.99 mL de soluciones de almidón a concentraciones 0,0025, 0,005, 0,0075, 0,01 %p/v, elaboradas a partir de una solución madre 0,02 %p/v; la medición de la absorbancia se realizó a 570 nm. Por consiguiente, se efectuó la extracción de la enzima α -amilasa de granos de *Zea Mays L* ICA V-305 y se utilizó 1 mL de dicho extracto crudo, con una concentración de proteínas de 12,51 μ g/mL, para evaluar el efecto del pH y la temperatura, en consecuencia, se obtuvo un pH y temperatura óptima de 6 y 80°C, respectivamente. Además, a sus condiciones óptimas, se evaluaron las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$, para las cuales se obtuvo un valor de 0,04624 %p/v y 1,497 %p/v.min⁻¹, respectivamente. Finalmente se determinó una actividad enzimática a pH 6, 80°C, empleando como sustrato una solución de almidón de 0.1% p/v, correspondiente a 1.677 UmL⁻¹ con el método de DNS y de 7.709 UmL⁻¹ con el método de Lugol, resultados que se compararon.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Martha Cecilia Daza Espinoza. Dra. en Ciencias-Química. Codirector: William Hidalgo Bucheli. Dr. en Química Ecológica

Abstract

Title: Standardization of the Lugol-carbohydrate method for the evaluation of the enzymatic activity of α -amylase from *Zea mays L.**

Author: María Camila Díaz Quintanilla, Astrid Carolina Gelves Abril **

Key Words: α -amylase, Lugol's method, starch, enzymatic activity.

Description:

The enzyme α -amylase represents about 25-30% of the total enzyme production in the world and, like starch, is extensively used in the food, paper, textile and detergent industries, among others. In this paper, the standardization of Lugol's method for the determination of the enzymatic activity of α -amylase using UV-Vis spectroscopy. For this purpose, the study of the preparation of the Lugol's reagent, the iodine-starch complex and their linearity, was carried out; therefore, the calibration curve was developed using 10 μ L of the Lugol's reagent at an iodine concentration of 0.658 M (1.5 %p/v of I₂ and 10%p/v of KI) and 2.99 mL of starch solutions at concentrations 0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01 %p/v, made from a 0.02 %p/v stock solution; the absorbance was measured at 570 nm. Consequently, extraction of the enzyme α -amylase from *Zea Mays L ICA V-305* grains was performed and 1 mL of the crude extract, with a protein concentration of 12.51 μ g/mL, was employed to evaluate the effect of pH and temperature; consequently, an optimum pH and temperature of 6 and 80°C, respectively, were obtained. In addition, at their optimum conditions, the kinetic constants K_m and V_{max} were evaluated, for which a value of 0.04624 %p/v and 1.497 %p/v.min⁻¹ were obtained, respectively. Finally, enzyme activity was determined at pH 6, 80°C, using as substrate a starch solution of 0.01%p/v, and corresponding to 1.677 UmL⁻¹ with the DNS method and 7.709 UmL⁻¹ with the Lugol's method, results were compared.

* Bachelor thesis

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Martha Cecilia Daza Espinoza. Dra. en Ciencias-Química. Codirector: William Hidalgo Bucheli. Dr. en Química Ecológica

Introducción

El almidón es una macromolécula constituida por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina (Copeland, et al., 2009), debido a su composición, es hidrolizado por la acción de las amilasas y representa la fuente principal de energía almacenada en los granos de cereales (Ellis, et al., 1999). La amilosa es un polímero lineal-helicoidal conformado por moléculas de glucosa conectadas por enlaces glucosídicos ($\alpha 1 \rightarrow 4$), sin ramificar. Por su parte, la amilopectina es un polímero ramificado, constituido por cadenas lineales de glucosa conectadas por enlaces glucosídicos ($\alpha 1 \rightarrow 4$), con puntos de ramificación debido a unidades de D-glucosa enlazadas mediante enlaces glucosídicos ($\alpha 1 \rightarrow 6$) helicoidales (Karim, et al., 2000); a su vez, al final de cada cadena polimérica se encuentra un grupo aldehído conocido como extremo reductor (El-Fallal, et al., 2012).

α -amilasa (α -1,4-glucano-4-glucanohidrolasa) es una endoenzima hidrolítica de retención, encargada de la catálisis hidrolítica del almidón, actuando sobre los enlaces glucosídicos internos ($\alpha 1 \rightarrow 4$) (Visvanathan, et al., 2020) dando lugar a oligosacáridos más cortos, entre ellos la glucosa, dextrinas y dextrinas límite, formadas como resultado de la suspensión de la hidrólisis cuando la enzima se encuentra con un punto de ramificación (Whistler & Daniel, 2000). Adicionalmente, la α -amilasa se encuentra mayormente en el sistema digestivo de muchos mamíferos, en microorganismos y en gran variedad de plantas (Kaphalia, 2014) es por ello que es posible extraerla de semillas, frutos, hojas, tallos, o incluso de las raíces, exhibiendo una mayor actividad al extraerse de un sustrato germinado (Tomasik & Horton, 2012). En el grano de la especie *Zea Mays L*, conocida comúnmente como “maíz” o “maíz de cultivo” (Awata, et al., 2019), se obtiene la energía necesaria para el crecimiento de la planta por medio de la degradación del almidón,

ubicado en el endospermo del grano, ocasionada por la acción de α -amilasa, la cual, es sintetizada en la etapa de germinación y representa casi el 30% de la proteína sintetizada en la segunda fase de dicha etapa (Sanwo & DeMason, 1992).

Todas las reacciones químicas catalizadas por enzimas son altamente sensibles a cambios en los factores externos, como la variación de la concentración de sustrato, la concentración de enzima, el pH, la temperatura y la presencia de inhibidores o activadores, que pueden llegar a determinar la velocidad inicial de reacción; por lo tanto, se han llevado a cabo diferentes métodos para caracterizar el papel de las enzimas en las reacciones químicas. Actualmente, entre los métodos amilo clásicos utilizados, se encuentra la prueba de Lugol y el más frecuente de todos, el método de DNS. En el método DNS, se determina la actividad enzimática por medio de la detección de los productos de la hidrólisis (azúcares reductores) (Visvanathan, et al., 2020). Por otra parte, en la prueba de Lugol, se determina la actividad enzimática por medio de la detección del almidón resultante después de la hidrólisis, debido a que el complejo yodo-almidón presenta un color característico azul oscuro que irá desapareciendo conforme actúa la enzima (Moulay, 2013); sin embargo, hasta el momento, no se ha reportado la estandarización del ensayo y por consiguiente, todos los estudios realizados son bastantes diversos, variando la preparación del reactivo, del complejo yodo-almidón y la medición de la absorción a diferentes longitudes de onda (Visvanathan, et al., 2020), por ejemplo, se ha desarrollado un ensayo basado en microplacas para cuantificar los complejos yodo-almidón formados con una solución de almidón de 2.0 g/L y una solución de $I_2:KI$ (0.2% p/v de I_2 y 2% p/v de KI), para con él, determinar la actividad enzimática de α -amilasa, que posteriormente fue comparada con las unidades de actividad obtenidas con el ensayo de azúcares reductores DNS (Xiao, et al., 2006); adicionalmente se ha reportado un método rápido y sensible para cuantificar el yodo en un medio donde el complejo yodo-almidón se haya

formado, utilizando dos soluciones $I_2:KI$ (1.3% p/v I_2 y 2.6% p/v de KI) (2% p/v de I_2 y 20% p/v de KI) y un método de reducción, seguido de alquilación y cromatografía de gases (Manion, et al., 2010).

En el presente trabajo, con el fin de estandarizar la prueba de Lugol, por medio de espectroscopia UV-Vis, como un método cuantitativo para la determinación de la actividad y evaluación de propiedades de la enzima α -amilasa extraída de *Zea Mays L*; inicialmente se estudió la preparación del reactivo de Lugol, la formación del complejo yodo-almidón y la linealidad del mismo al variar la concentración de la solución de almidón presente en la muestra; en segunda instancia, ya determinada la preparación del reactivo de Lugol con el cual, se elaboró la curva de calibración para el método de Lugol, se realizó la extracción de la enzima α -amilasa de granos de *Zea Mays L* ICA V-305. Por consiguiente, se evaluó la variación de la concentración de enzima, el pH, la temperatura y la concentración de sustrato, para determinar las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$. Por último, se compararon los resultados obtenidos para la actividad enzimática de α -amilasa, bajo sus condiciones óptimas empleando el método de Lugol y el método DNS.

1. Justificación

La α -amilasa es una enzima altamente empleada en la industria, principalmente en la perteneciente a los derivados del almidón, debido a su acción catalítica sobre el mismo, permitiendo la obtención de glucosa y maltosa, las cuales cuentan con numerosas aplicaciones. En el ámbito de salud se usa en tratamientos para enfermedades del sistema digestivo, mientras que en la industria de alimentos posee un papel mucho más amplio, desde la fabricación de jarabes ricos en azúcar disminuyendo su viscosidad, hasta la elaboración de pan proporcionando dextrinas

fundamentales para la constante actuación de la levadura en el proceso de fermentación de la masa; en la manufacturación textil, la enzima remueve el almidón que ha sido previamente aplicado para facilitar el manejo de la tela, devolviéndole así la fuerza y rigidez a la misma; así mismo, cumple una función muy similar en el papel, eliminando el almidón adherido durante el proceso de fabricación. Adicionalmente, su acción resulta también significativa para potenciar la detergencia en blanqueadores de lavandería y en la fermentación de almidón para producir etanol, uno de los líquidos empleados en gran medida en la preparación de biocombustibles (Saini, et al., 2017).

Teniendo en cuenta su importancia en la industria, resulta prometedor el estudio de las propiedades fisicoquímicas y los parámetros cinéticos de la enzima con el fin de avanzar en el desarrollo de los procesos relacionados con la obtención, caracterización y aplicación de la misma, por lo cual, se plantea la utilización de la prueba de Lugol como método cuantitativo para la determinación de la actividad enzimática, dado que sería un ensayo mucho más específico para la α -amilasa que permite determinar su actividad en relación con la desaparición del sustrato y no con la aparición de producto, ya que tras la acción enzimática de α -amilasa no se obtiene un único producto, si no, maltosa, dextrinas y otros oligosacáridos; por lo tanto, el método de Lugol podría reemplazar y mejorar los métodos comúnmente utilizados, como el método de DNS o ensayos colorimétricos que emplean yodo y funcionan como métodos cualitativos de la presencia de almidón. A su vez, la prueba de Lugol es una prueba sensible, sencilla, económica e innovadora; sin embargo, solo en algunos estudios de α -amilasa se ha aplicado la prueba de Lugol de forma cuantitativa, sin especificar un procedimiento claro y parámetros o condiciones de aplicación del mismo, esto ocurre ya que el ensayo no ha sido estandarizado para la cuantificación rigurosa de almidón en una muestra.

¿Por qué α -amilasa de maíz? Además de ser un producto abundante a nivel mundial, siendo Estados Unidos, China, Brasil, Unión Europea, Ucrania y Argentina (Francomano & Picardi SRL, 2017) los mayores productores, en Colombia se ha incrementado la producción de maíz a través de los años (AgroInsumos S.A.S, 2018), facilitando así su obtención; asimismo no se presenta evidencia del estudio de α -amilasa extraída de *Zea Mays L* en el marco nacional, lo cual proporciona la oportunidad de investigar la enzima en variedades de maíz cultivadas en Colombia.

De tal forma que, al estudiar el reactivo de Lugol y la formación del complejo yodo-almidón, se establece la preparación y aplicación de la prueba de Lugol como un método cuantitativo para medir la presencia de almidón en solución, por medio de espectroscopia UV-Vis; Asimismo, se comprueba su utilidad y reproducibilidad, mediante la caracterización de α -amilasa extraída de *Zea Mays L.*, determinando su actividad enzimática; la cual se compara con la obtenida por el método DNS, que se caracteriza por ser ampliamente utilizado para el estudio de la enzima.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Estandarizar el método de Lugol-carbohidrato para determinar la actividad enzimática de α -amilasa aislada de *Zea mays L.*

2.2. Objetivos Específicos

Establecer las condiciones específicas para la aplicación cuantitativa de la prueba de Lugol en función de la concentración de almidón presente en una solución.

Obtener extractos enzimáticos que contengan la enzima α -amilasa activa a partir de semillas germinadas de *Zea Mays L.*

Determinar la actividad enzimática de α -amilasa por medio del método de Lugol y el método de DNS.

Evaluar el efecto de la temperatura, concentración de sustrato, concentración de enzima y pH sobre la actividad enzimática de α -amilasa.

Determinar los parámetros enzimáticos $V_{\text{máx}}$ y K_m de α -amilasa mediante el método Lineweaver-Burk.

3. Marco teórico

3.1. Taxonomía y características morfológicas de *Zea Mays L*

La especie *Zea Mays L.* corresponde a uno de los cultivos de cereal mayormente empleado a nivel mundial y conocido de forma popular como “maíz” o “maíz de cultivo”, esta especie de planta espermatofita (*Spermatophyta*) perteneciente al género *Zea*, se encuentra dentro de la familia de las gramíneas formando parte de la tribu de las *Andropogoneae*, ubicada en la subdivisión *Magnoliophyta*, clase *Liliopsida* y subclase *Commelinidae* (Tabla 1); esta planta posee uno de los granos de cereal con mayor tamaño (entre 5-9 mm) (Sramkova, et al., 2009), y se destaca por su capacidad de almacenamiento de proteínas (10%), almidón (72%), grasas (4%) (Awata, et al., 2019) y principalmente hidratos de carbono como lo son la amilosa y la amilopectina. El grano o semilla de maíz nace de la conclusión del paso de doble fecundación del óvulo por el grano de polen en la planta (Rajjou, et al., 2011) y se encuentra constituido por tres componentes principales: una pared externa conocida como la corteza, un compartimiento más interno llamado endospermo y por último el embrión (Awata, et al., 2019) (Figura 1.a).

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Zea Mays L.

Taxonomy	Classification
Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta (Vascular plant)
Supper-division	Spermatophyta (Seed plant)
Divission	Magnoliophyta (Flowring plant)
Class	Liliopsida (Monocotyledon)
Subclass	Commelinidae

Taxonomy	Classification
Order	Cyperales
Tribe	Andropogoneae
Family	Poaceae (Grass family)
Subfamily	Panicoideae
Genus	Zea
Species	Zea mays L
Subspecies	Mays

Nota. Adaptado de Understanding tropical maize (*Zea Mays L.*): *The major monocot in modernization and sustainability of agriculture in sub-Saharan Africa*, por L.A. Awata, et al., 2019, *International Journal of Advance Agricultural Research*, doi:10.33500/ijaar.2019.07.004.

La corteza del grano está conformada por: una capa protectora llamada pericarpio que se desarrolla a partir de la pared del ovario, y principalmente por la testa, que además de funcionar como un depósito de fibra, es quien brinda protección a la semilla del estrés biótico, lesiones mecánicas, depredación por terceros (insectos) o de su desecación, esto gracias a que es una estructura de membranas celulares y sustancias grasas que se adhieren a la pared externa de la misma; otra de sus funciones consiste en regular el intercambio de gases con el exterior, la captación de oxígeno (Bewley, et al., 2013), la capacidad de hidratación y el control de nutrientes para el embrión y el endospermo (Awata, et al., 2019). Por su parte el endospermo es el componente más grueso del grano, constituyendo entre 80% - 85% del mismo, sin embargo, su tamaño puede variar según la cantidad de producto almacenado; su principal responsabilidad es la de servir como una reserva de nutrientes (proteínas, lípidos, enzimas y carbohidratos) que serán utilizados por la planta de forma previa al desarrollo y conclusión de sus estructuras fotosintéticas. En el endospermo, dentro de un orgánulo celular especial, llamado vacuola de almacenamiento de proteínas (VAP), suele depositarse las proteínas de almacenamiento y están rodeadas, al menos

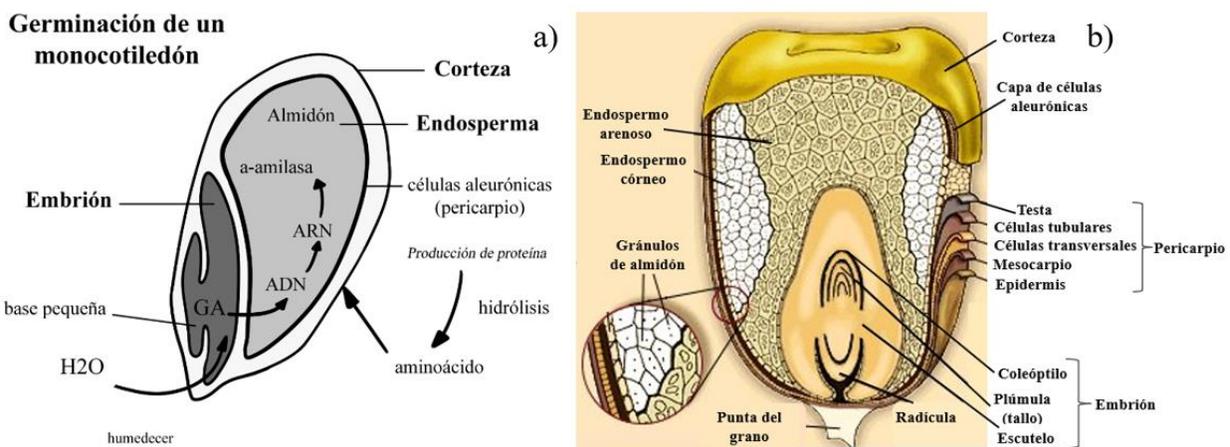
durante el desarrollo, por una membrana procedente del sistema celular de endomembranas. Las proteínas de almacenamiento cumplen la función de almacenar C, N y S para apoyar el crecimiento temprano de la plántula y en el grano de maíz, el 85% es constituido por prolaminas (zeínas), el 4% albúminas y el 2% globulinas; por lo tanto, en el centro de la VAP se encuentra la a-zeína y está rodeada por una fina capa de b- y g-zeína. Adicionalmente, el endospermo contiene una multitud de proteínas además de las proteínas de almacenamiento mencionadas anteriormente. Estas pueden desempeñar funciones estructurales o metabólicas (por ejemplo, proteínas presentes en las paredes y membranas celulares, enzimas y componentes de los sistemas de transporte) o ser componentes de almacenamiento menores presentes en los cuerpos proteicos (Bewley, et al., 2013). A su vez, debido a que el endospermo ocupa un gran espacio en el grano, se encuentra dividido en tres secciones, una cuya función es rodear y preservar el embrión, otra que corresponde al área más grande del endospermo conocida como sección central y una última que opera como barrera de transferencia (Figura 1.b); cabe resaltar que el endospermo controla de cierta forma la latencia (capacidad de germinación) de la semilla ya que el punto de emergencia de la radícula se encuentra dentro de él (Awata, et al., 2019).

El embrión, indispensable para la germinación de la semilla, corresponde del 9 al 10% de volumen de la misma y reúne una gran cantidad de nutrientes (33% de grasa, 19% de proteínas, minerales y vitaminas del complejo B y E), adicionalmente está enriquecido en ácidos grasos insaturados como el ácido oleico y linoleico; se encuentra conformado por un complejo embrionario, ubicado en un extremo inferior del endospermo, de tipo monocotiledón, es decir que posee un sólo cotiledón gracias a la clase a la que pertenece la especie. El eje embrionario a su vez, está integrado por cuatro componentes: (i) la radícula, localizada próxima al micrópilo y que posee dentro de sí el origen de la raíz embrionaria que se desarrolla una vez concluida la

germinación, (ii) el hipocótilo conocido como la parte del tallo del eje embrionario que colinda en un extremo con el nacimiento de la radícula y en otro extremo con el cotiledón, (iii) el epicótilo se identifica como el primer brote que nace de la superficie del cotiledón; tras las primeras etapas de germinación, este puede estar desarrollado de forma correcta y así cumplir su función como reserva de nutrientes o bien puede mantener su apariencia aplanada (Figura 1.b) (Awata, et al., 2019).

Figura 1

Anatomía del grano de maíz.



Nota. a) Esquema de componentes principales. Constituido por la corteza, el pericarpio, testa, endospermo y embrión. Adaptado de *Production and Characterization of Amylases from Zea Mays Malt*, por J.P. Biazus, et al., 2009, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, doi:10.1590/S1516-89132009000400024. b) Perspectiva del grano de maíz, desde la sección transversal. Adaptado de *Wheat*, por T. Editors of Encyclopedia Britannica, 2021, *Encyclopedia Britannica*, <https://www.britannica.com/plant/wheat>.

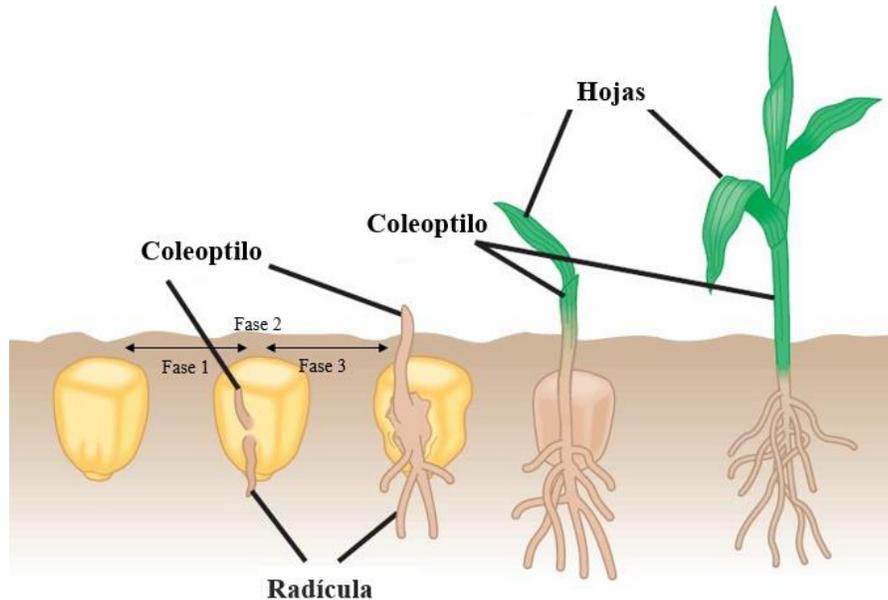
Al periodo de transición de la semilla de un estado latente a uno activo se le conoce como germinación, para que esta etapa se ponga en marcha y además se desarrolle de forma correcta, se deben garantizar condiciones de luz, oxígeno, humedad (superior al 30%, nunca menor a 10%) y temperatura óptimas (18-26°C), esta última se refleja retrasando el tiempo que tarda en comenzar el proceso, el cual en condiciones normales debe iniciar a los 5 u 8 días, una vez se inicia, a partir

del primer día se cuenta un % de germinación menor al 5% que irá aumentando primero de forma lenta y luego más acelerada hasta alcanzar el 80-100% de germinación; dentro de la etapa de germinación se destacan tres fases principales que se desenvuelven cronológicamente (Rajjou, et al., 2011), la fase 1 a la que llamaremos imbibición, consiste en la absorción de agua por parte de la semilla hasta llegar a 1.5 o 2 veces su peso seco (Awata, et al., 2019), durante la fase 2 se reanudan aquellos procesos metabólicos propios de la semilla (síntesis de proteínas, carbohidratos y degradación de reservas energéticas), por ejemplo, en el endospermo, se da comienzo a la síntesis de la enzima α -amilasa que representa aproximadamente el 30% de la proteína sintetizada durante dicha fase y es quien se encarga de degradar todos aquellos hidratos de carbono (amilosa y amilopectina) (Sanwo & DeMason, 1992), la etapa de germinación finaliza en la fase 3 (Figura 2) cuando se da la emergencia de la radícula a través de la superficie del endospermo de la semilla y cuyo origen se encuentra en el embrión, más exactamente en el coleóptilo donde se encontraba previamente envuelto (Figura 1.b); es a partir de este punto que se considera un porcentaje de emergencia y se da inicio a la etapa conocida como el crecimiento de la plántula (Rajjou, et al., 2011), durante esta se desarrolla la plántula conformada por el mesocotilo y la radícula que emerge del cariósido.

Aunque bien es cierto que los granos de cereal no se caracterizan por sus altas concentraciones de enzima α -amilasa, se ha comprobado que la cantidad de la misma aumenta considerablemente tras la etapa de germinación (Estados Unidos Patente nº 4.116.770, 1978), sin embargo de este alto contenido enzimático suele perderse un gran cantidad durante la fase de extracción; a pesar de ello conforme pasa el tiempo la semilla de *Zea Mays L* se ha vuelto uno de los granos mayormente empleados para estudios moleculares.

Figura 2

Etapa de germinación del maíz.



Nota. Visualización de las tres fases que conforman la etapa de germinación. (i) imbibición de agua (ii) reactivación del metabolismo (iii) emergencia de la radícula y posteriormente del tallo (plúmula), se observa además la etapa de crecimiento de la plántula. Adaptado de *BIOLOGY: Concepts & connections*, por B. Cummings, 2003, Pearson Education inc, http://www.bio.miami.edu/dana/pix/seed_germination.gif.

3.2. El almidón

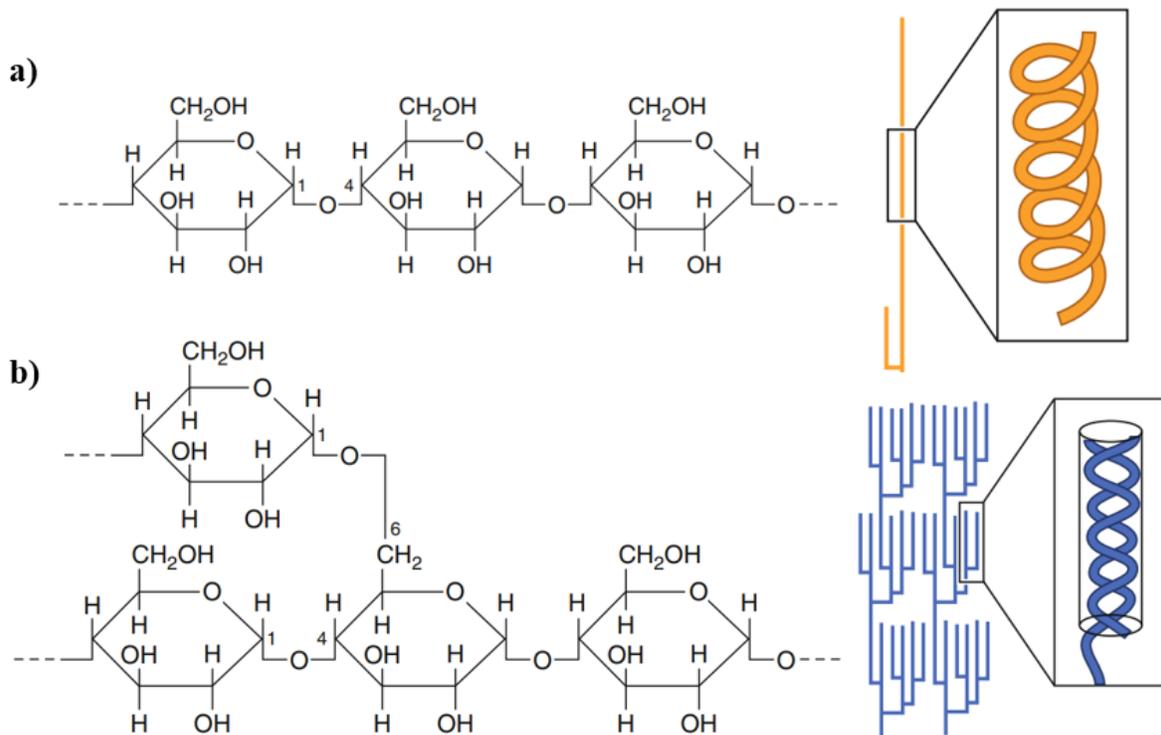
El almidón es la fuente principal de energía almacenada en los granos de cereales, aunque la cantidad de almidón contenida en los granos varía, generalmente se encuentra entre el 60 y 75% del peso del grano y proporciona 70–80% de las calorías consumidas por los seres humanos en todo el mundo; de igual forma se distingue por sus numerosas aplicaciones industriales que van desde la producción de adhesivos, pesticidas, cosméticos, detergentes (surfactantes, agentes blanqueadores, etc), agentes de acristalamiento, floculantes y modificadores de viscosidad hasta aplicaciones en conservación de órganos para trasplantes, rellenos biodegradables y sus usos más comunes en la industria textil y del papel (Ellis, et al., 1999).

El almidón se deposita en el interior de las células vegetales formando agregados o gránulos insolubles y semicristalinos del cual tanto su forma y tamaño, varía entre 1-150 μm (Whistler & Daniel, 2000), como la estructura y organización de sus moléculas internas, dependen del origen botánico del mismo incluyendo los almidones de tipo comercial (El-Fallal, et al., 2012) estos gránulos se encuentran muy hidratados debido a la presencia de los múltiples grupos hidroxilo expuestos que pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua (Atwell & Thomas, 1999). La polimerización de la glucosa en almidón se da a través del enlace glucosídico entre el oxígeno y el carbono 1 de cada unidad D-glucosa, dicho enlace se caracteriza por ser muy estable a pH altos, con una tendencia a hidrolizarse a pH bajos; adicionalmente al final de cada cadena polimérica se encuentra un grupo aldehído que se conoce como extremo reductor (El-Fallal, et al., 2012). Como conclusión del proceso de polimerización resultan dos tipos de polímeros de glucosa (i) amilosa y (ii) amilopectina, las cuales representan el 98-99% del peso seco de los gránulos, el porcentaje restante corresponde a lípidos, minerales y fosfatos esterificados a hidroxilos de glucosa (Copeland, et al., 2009).

La amilosa es un polímero esencialmente lineal formado por aproximadamente 6000 unidades D-glucosa, expuestas en cadenas largas, sin ramificar y conectadas por enlaces glucosídicos ($\alpha 1 \rightarrow 4$); a pesar de que existen numerosos estudios donde se clasifica a la cadena de amilosa como una cadena lineal, se ha demostrado y se considera que además posee una estructura helicoidal conformada por seis unidades D-glucosa en cada vuelta (Figura 3.a), la cual le posibilita la formación de complejos con el yodo (Dziedzic & Kearsley, 1995) de los que se profundizará más adelante. Por otro lado, la molécula de amilopectina, uno de los homopolímeros con mayor peso molecular en la naturaleza, posee aproximadamente 2.000.000 de unidades de D-glucosa por lo que comparada con la amilosa es de mayor tamaño; la amilopectina está constituida por cadenas

lineales más cortas conectadas por enlaces glucosídicos ($\alpha 1 \rightarrow 4$), cada 20-30 (Karim, et al., 2000) unidades de D-glucosa se encuentran enlazadas (ramificadas) a aproximadamente 10-60 unidades de D-glucosa mediante enlaces glucosídicos ($\alpha 1 \rightarrow 6$) (Lehninger, 2009) a los que llamaremos puntos de ramificación, esto resulta en la unión entre una unidad de glucosa de la cadena de amilosa y un carbono hidroximetil en la posición 6 de un residuo de glucosa de la amilopectina, de esta forma alrededor del 4-5% de los residuos de D-glucosa presentes en la amilopectina están implicados en puntos de ramificación (Karim, et al., 2000); las cadenas de amilopectina que se constituyen de más de 10 unidades de glucosa se disponen en dobles hélices (Figura 3.b) (Copeland, et al., 2009), cada doble hélice contiene seis unidades de glucosa (en conformación de silla) por vuelta, además de poseer enlaces de hidrógeno entre las cadenas pero no dentro de ellas, las dobles hélices paralelas están conectadas mediante una red de enlaces de hidrógeno. Las diferencias estructurales entre estos dos polímeros contribuyen a diferencias significativas en las propiedades y la funcionalidad del almidón; por ejemplo, la amilosa se caracteriza por formar geles y películas fuertes, además de ser insoluble en agua fría (al igual que el almidón) (El-Fallal, et al., 2012), mientras que la amilopectina es completamente soluble en agua y forma películas débiles con poca respuesta gelificante.

Los gránulos de almidón poseen una estructura cristalina tipo A de simetría monoclinica que ha sido ampliamente estudiada, y de la que se han observado anillos de crecimiento que se extienden desde el centro de origen (hilio) hacia la superficie de cada uno de los gránulos, dentro de ellos se encuentran regiones cristalinas y amorfas, ambas se encuentran conformadas por cadenas de amilopectina que se hallan empaquetadas en una red cristalina y a las que se les atribuye en gran parte la cristalinidad del almidón, mientras que las cadenas de amilosa están comprendidas en las regiones amorfas de los gránulos (Copeland, et al., 2009).

Figura 3*Estructura del almidón.*

Nota. a) Estructura de la amilosa, hélice helicoidal (en naranja) b) Estructura de la amilopectina, doble hélice (en azul). Las líneas punteadas representan los extremos no reductores. Adaptado de *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*, por J.D. Bewley, 2013, *Springer Science+Business Media*, 10.1007/978-1-4614-4693-4_1.

3.3. Caracterización de α -amilasa

3.3.1. Clasificación y función

Las amilasas se clasifican y tipifican (Nomenclatura de enzimas IUBMB) según sus propiedades catalíticas en transferasas (EC2), isomerasas (EC5) e hidrolasas (EC3) entre otras; α -amilasa (α -1,4-glucano-4-glucanohidrolasa) es una enzima hidrolítica (hidrolasa GH EC 3.2.1) de retención, y a su vez es endoactiva conforme su especificidad de acción, es decir, que actúa sobre

enlaces internos dando lugar a oligosacáridos más cortos (Taniguchi & Honnda, 2009). La endoenzima α -amilasa (EC 3.2.1) se caracteriza por catalizar la hidrólisis inicial del almidón, actuando sobre los enlaces ($\alpha 1 \rightarrow 4$) glucosídicos, más específicamente los pertenecientes a la amilosa y la amilopectina, esto lo hace como se mencionó previamente, debido a su mecanismo de retención, (Visvanathan, et al., 2020) de esta forma da lugar a dextrinas tales como moléculas de maltosa (dímeros de glucosa), maltotriosa (trímeros de glucosa), el oligosacárido más pequeño a partir de la amilosa como lo es la glucosa y productos provenientes de la amilopectina como dextrinas límite, estas son oligosacáridos ramificados de 6 u 8 monómeros de glucosa integrados por enlaces ($\alpha 1 \rightarrow 6$) glucosídicos (Lowe, 2004) que se resisten a la acción de α -amilasa, por lo que cuando la enzima se encuentra con un punto de ramificación, la hidrólisis se suspende dando como resultado a lo que se conoce como una dextrina límite de la enzima (Whistler & Daniel, 2000).

Este tipo de enzimas se encuentran mayormente en el sistema digestivo de muchos mamíferos, en microorganismos y en gran variedad de plantas (Kaphalia, 2014) es por ello que es posible extraer a α -amilasa de semillas, frutos, hojas, tallos, o incluso de las raíces; la cantidad de enzima y la capacidad de hidrólisis está sujeta a la forma en que se desarrolle la fase de maduración (previa a la etapa de germinación) del sustrato vegetal del que se haya obtenido la enzima, por lo que la enzima α -amilasa aislada de un sustrato germinado tendrá una hidrólisis más completa del almidón (Tomasik & Horton, 2012). α -amilasa además representa cerca del 25-30% de la producción total de enzimas en el mundo y al igual que el almidón es ampliamente empleada en industrias de alimentos, papel, textil y de detergentes; por ejemplo, en el procesamiento del huevo, resulta relevante para efectos de calidad, conocer la actividad de α -amilasa con el fin de garantizar el correcto desarrollo del proceso de pasteurización; en el tratamiento de papel, como control de calidad de escritura tras el recubrimiento de almidón, α -amilasa ayuda a determinar qué tan suave

será reduciendo la viscosidad del mismo (por medio de hidrólisis); en el área textil, la enzima α -amilasa se usa con el propósito de eliminar el almidón aplicado para la deformación de los tejidos y en la formulación de los detergentes se utiliza como ingrediente principal para eliminar la suciedad a base de almidón de las telas; de forma general la enzima se desempeña en el control de calidad de diversos productos, no obstante la actividad de α -amilasa se evalúa con fines investigativos, sustancialmente para el tratamiento de la diabetes mellitus, en el que se evalúa α -amilasa a fin de estudiar el efecto inhibitor de los fitoquímicos presentes de forma natural en la enzima (Visvanathan, et al., 2020).

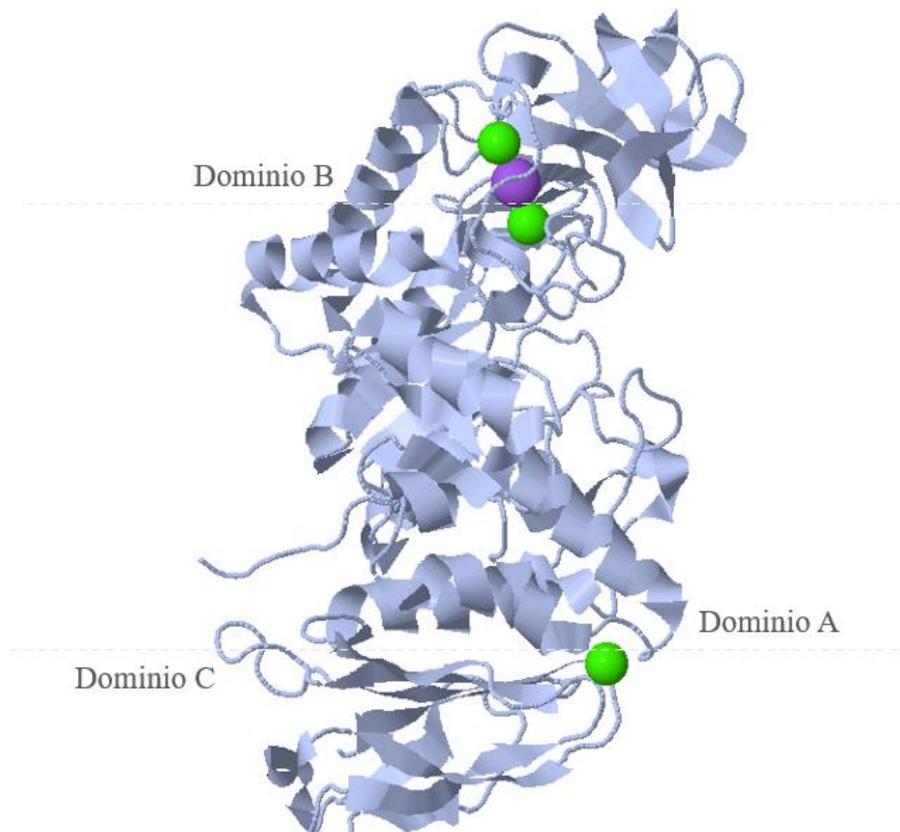
3.3.2. Estructura

La enzima α -amilasa, contiene un trío de iones coordinados $\text{Ca}^{2+}\text{-Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ y un ion de Ca^{2+} adicional (ubicado en un dominio diferente), todos ellos esenciales para la activación alostérica, estabilidad e integridad de su estructura terciaria (Figura 4). La estructura terciaria está formada por tres dominios (i) dominio A (ii) dominio B y (iii) dominio C, estos dos últimos se sitúan de forma opuesta y a cada lado del dominio A, siendo este el más conservado a lo largo de la familia de α -amilasa, se caracteriza por poseer una especie de pliegue de gran simetría compuesto por ocho hojas β paralelas ubicadas en forma de barril y rodeado de ocho hélices α ; este dominio comprende uno de los componentes más importantes en la función catalítica de la molécula como lo son los residuos aminoacídicos que participan activamente en la catálisis y unión de sustrato a la enzima, estos se encuentran ubicados en bucles pertenecientes a los extremos de carbono de las hojas β de este dominio (Figura 5.a). Por su parte el dominio B, que varía un poco en la familia de α -amilasa, se sitúa entre la tercera hélice α y la tercera hoja β a la que se encuentra enlazado por medio de un enlace disulfuro, asimismo contiene alrededor de 44-133 residuos aminoacídicos además del rol que desempeña en la unión del sustrato y del ion Ca^{2+} (Figura 5.b); continuando

con el orden de ideas, el dominio C cuenta con una estructura de pliegue en forma de barril antiparalelo compuesto por cinco hojas β (Figura 5.c), ligadas al dominio A por una sola de ellas a través de una cadena polipeptídica, sin embargo no se conoce mucho sobre su funcionamiento o el papel que desarrolla dentro de la estructura de la enzima (El-Fallal, et al., 2012).

Figura 4

Estructura terciaria de α -amilasa.

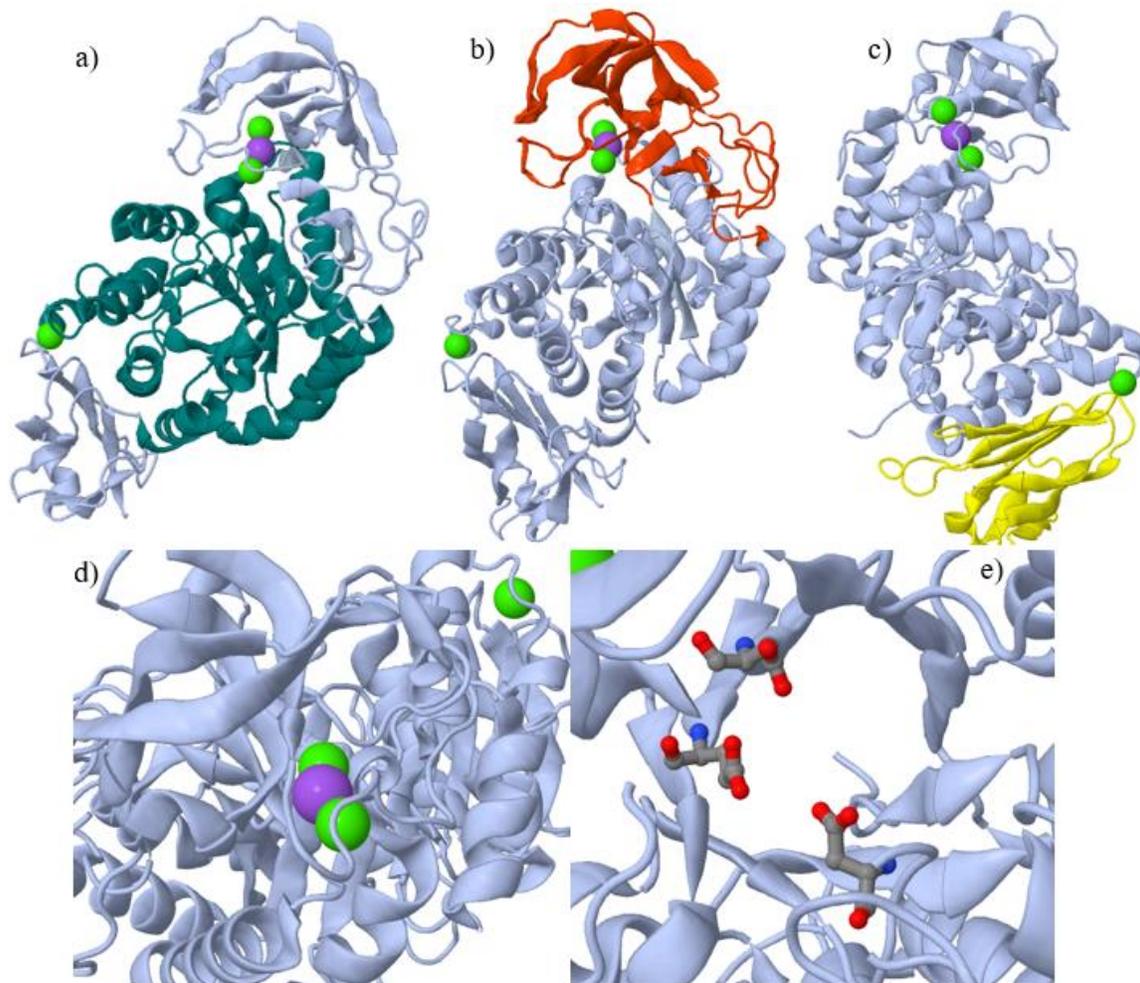


Nota. Conformada por tres iones Ca^{2+} (en verde), un ion Na^{+} (en púrpura) y tres dominios: dominio A, hojas β y hélices α en forma de barril que contienen el sitio activo de la enzima, situados en la parte central de la estructura, dominio B y dominio C ubicados en la región superior e inferior, respectivamente. Adaptado de *Amylase*, por S. Riley, et al., 2019, *Proteopedia -Life in 3D-*, https://proteopedia.org/wiki/index.php/Amylase#cite_note-human-7.

Su sitio activo que tiene forma de “v” o hendidura abierta, se ubica en medio de los extremos carboxílicos correspondientes a los dominios A y B (Figura 5.d), por lo tanto los residuos aminoacídicos que se encuentran en el dominio B también participan en la formación del complejo enzima-sustrato; el sitio de unión del sustrato (sitio activo) está conformado por alrededor de 5 a 11 subsitios denotados con las letras A-K y encargados de interactuar con las unidades de glucosa del sustrato, el sitio catalítico de la enzima está entre el subsitio F y el subsitio G, se caracteriza por poseer una triada catalítica de residuos aminoacídicos (Figura 5.e), glutamato (característico de cada especie) del cual se especula que es donante de protones (Lowe, 2004), Aspartato 206 (Asp206) y Aspartato 297 (Asp297) (Muralikrishna & Nirmala, 2005) que bien pueden actuar como nucleófilos (Lowe, 2004); dichos residuos establecen enlaces de hidrógeno con los oxígenos de las unidades de glucosa del sustrato, esto puede darse directamente con la molécula de sustrato o a través de una molécula de agua (El-Fallal, et al., 2012), lo que quiere decir que el sitio activo de la enzima alberga los grupos nucleofílicos y electrofílicos responsables de la escisión del enlace glucosídico ($\alpha 1 \rightarrow 4$) (Greenwood, et al., 1965); esto lo hará ensamblando ocho unidades D-glucosa, de las cuales seis quedarán realmente acomodadas en el sitio de unión y las otras dos en el siguiente punto de escisión, la ruptura tiene lugar entre el tercer y cuarto residuo D-glucosa ensamblado en el sitio activo (Terra & Ferreira, 2005).

Figura 5

Visualización detallada de la estructura terciaria de α -amilasa.



Nota. (a) dominio A (en verde) quien comprende el trío de iones Ca^{2+} - Na^{+} - Ca^{2+} (b) dominio B (en rojo), (c) dominio C (en amarillo) que alberga un ion Ca^{2+} , (d) sitio activo de la enzima, localizado entre el dominio A y B, y por último (e) triada catalítica de residuos aminoacídicos ubicados en el dominio A de la estructura enzimática. Adaptado de *Amylase*, por S. Riley, et al., 2019, *Proteopedia -Life in 3D-*, https://proteopedia.org/wiki/index.php/Amylase#cite_note-human-7.

3.3.3. *Mecanismo catalítico*

Se considera que las α -amilasas pertenecen a la familia de enzimas conocidas más eficientes, debido a que aumentan en gran medida la velocidad de hidrólisis del enlace α -glucosídico que espontáneamente tiene un valor aproximado de $2 \times 10^{-15} \text{ s}^{-1}$ a temperatura ambiente (El-Fallal, et al., 2012). El mecanismo catalítico establecido de la familia α -amilasa siempre está constituido por tres residuos catalíticos esenciales (Asp, Glu y Asp) ubicados cerca del sitio activo (Kuriki & Imanaka, 1999), que varían de una especie a otra. De estos tres residuos, han sido generalmente aceptados, el Glu 230 y Asp 206 cumpliendo el papel de catalizador ácido (donante de protones) y base (nucleófilo), respectivamente, en la reacción (El-Fallal, et al., 2012). Parte de la energía de unión de la enzima al sustrato aparece como distorsión en el enlace glucosídico que se va a escindir. Del mismo modo, el subsitio situado directamente a la izquierda del centro catalítico tiene una energía de unión al sustrato baja o negativa, lo que sugiere que, cuando el sustrato entra en el sitio activo, es distorsionado por la enzima en la dirección del estado de transición para la catálisis. Con respecto a la unidad de glucosa que ocupa este subsitio, no se permite una sustitución de sus grupos OH, lo que sugiere que los grupos OH libres de los carbonos en las posiciones 2, 3 y 6 están implicados en una especie de tensión o torsión. Los grupos OH de la glucosa pueden estar implicados tanto como donantes de enlaces de hidrógeno, como aceptores o incluso ambos. Los hidroxilos del carbono 3 y 6, el oxígeno glucosídico del carbono 4, y todas las unidades de D-glucosa restantes al costado izquierdo actúan para anclar la mitad izquierda de la unidad de glucosa. La tensión que ocurre sobre el OH unido al carbono 2 induce una torsión sobre el enlace C2-C3, elevando así el carbono 1 de tal forma que los carbonos 1, 2 y 6, y el oxígeno del anillo quedan coplanares como se requiere para un ion oxicarbonio (Figura 6). Simultáneamente se produce un alargamiento y debilitamiento del enlace C1-O1 (French, 1981).

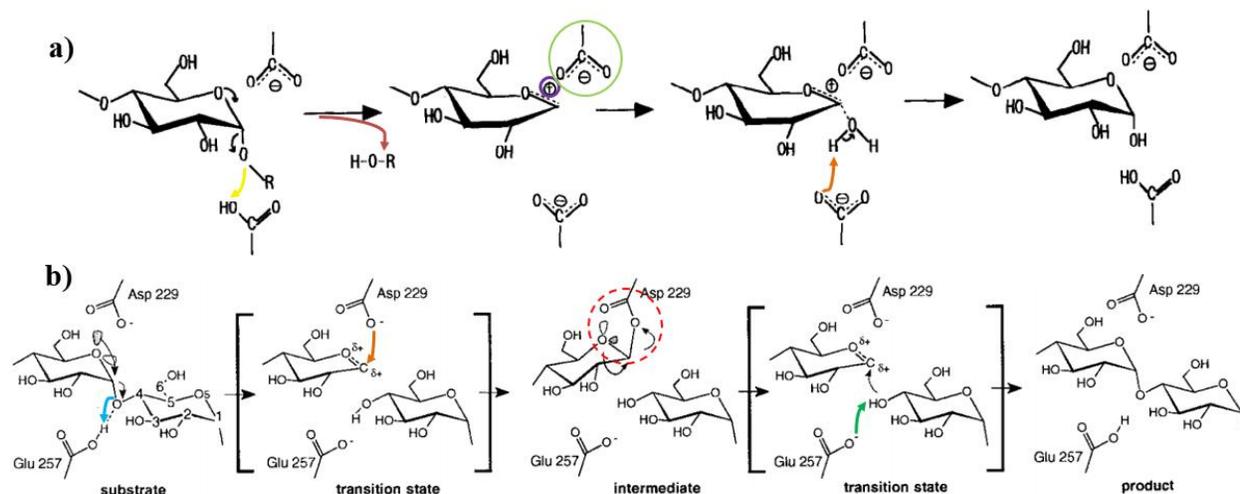
glucosídico; por consiguiente, el fragmento del extremo reductor del sustrato, H-O-R, sale del centro catalítico. Un grupo carboxilato favorece la formación y la estabilidad del ion carbonio intermedio. El ion hidroxilo del agua ataca nucleofílicamente al ion carbonio intermediario para terminar la reacción (Kuriki & Imanaka, 1999). En la reacción de tipo SN2 (Figura 7.b), después de que el sustrato se ha unido en el sitio activo, el glutamato dona un protón al oxígeno del enlace glucosídico, es decir al oxígeno ubicado entre dos moléculas de glucosa en los subsitios -1 y +1; el oxígeno carboxílico del aspartato nucleófilo ataca el C1 de la glucosa en el subsitio -1; allí se forma un intermediario β -glucopiranosilo-enzima a través de un estado de transición similar al oxicarbonio, enseguida la molécula de glucosa protonada en el subsitio +1 abandona el sitio activo mientras que una molécula de agua o una nueva molécula de glucosa se desplaza de nuevo al sitio de unión y realiza un ataque nucleofílico en el C1 que se encuentra formando un enlace covalente entre la unidad de glucosilo en el subsitio -1 y el Asp206; por último, se forma de nuevo un estado de transición similar al ion oxicarbonio y el catalizador base glutamato acepta un hidrógeno ya sea de una molécula de agua entrante o una molécula de glucosa recién ingresada en el subsitio +1, para que de esta forma el oxígeno del agua o de la glucosa entrante reemplace el oxígeno del enlace oxicarbonio entre la molécula de glucosa en el subsitio -1 y el aspartato, dando lugar a la formación de un nuevo grupo hidroxilo en la posición C1 de la glucosa en el subsitio -1 (El-Fallal, et al. , 2012).

A su vez, se han propuesto varios modelos para el patrón de acción de α -amilasa, como la acción aleatoria (o ataque multicadena) y la acción de ataque múltiple. En la primera, los enlaces en el polímero se hidrolizan sucesivamente por completo, antes de la disociación del complejo enzima-sustrato. Por otra parte, en la segunda, solo se hidroliza un enlace por encuentro efectivo (El-Fallal, et al., 2012). Aun así, en cualquiera de los dos casos, el primer ataque hidrolítico es

aleatorio, siendo preferente la escisión catalítica del enlace glucosídico, uniendo ocho unidades de glucosa en las condiciones más favorables, es decir, seis en un lado y dos en el otro del punto de escisión (Greenwood, et al., 1965).

Figura 7

Mecanismo catalítico de α -amilasa.



Nota. a) Reacción SN1. Se da el ataque del oxígeno del grupo carboxílico donando un protón al oxígeno glucosídico (en amarillo) seguido por la salida del extremo reductor (en rojo), el carboxilato (en verde) estabiliza la formación del ion carbonio (en morado) mientras que el agua tras un ataque nucleofílico finaliza la reacción (en naranja). Adaptado de *The Concept of the α -Amylase Family: Structural Similarity and Common Catalytic Mechanism (Review)*, por T. Kuriki, et al., 1999, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80114-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80114-5). b) Reacción SN2. El glutamato dona un protón al oxígeno glucosídico (en celeste), por su parte el aspartato ataca nucleofílicamente al C1 (en naranja) dando lugar al intermediario β -glucopiranosilo-enzima (en rojo), previo a finalizar la reacción se forma un estado de transición y el glutamato obtiene devuelta el protón (en verde). Adaptado de *X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family*, J. Uitdehaag, et al., 1999, *Nature Structural Biology*, doi:10.1038/8235.

3.3.4. *Propiedades de la enzima*

Resulta de suma importancia resaltar que, aunque se hace referencia a datos respectivos a las propiedades fisicoquímicas de la enzima, estos solo representan rangos de valores aproximados, ya que la gran mayoría de sus propiedades difieren unas con otras debido a que dependen principalmente del método y la fuente de la cual fue aislada.

En esta ocasión, la enzima fue extraída de uno de los cereales más conocidos a nivel mundial, como lo es el “maíz” o “maíz de cultivo” el cual es considerado una de las fuentes más eficientes de α -amilasa (Tomasik & Horton, 2012), y que además, el grano germinado, en comparación con el no germinado, resulta mejor materia prima para la extracción; El peso molecular de la enzima α -amilasa de forma general se encuentra en un rango de 50-230 kDa, es un rango amplio ya que como se mencionó previamente, el peso molecular es una de las características de la enzima que más varía conforme la fuente de obtención de la misma, ya sea un microorganismo, un cereal o animal; por ejemplo las α -amilasas extraídas del hongo *T. lanuginosus* tienen un peso de 24 kDa (Nguyn, et al., 2002), α -amilasa del cereal mijo presenta un peso entre 22-26 kDa (Nirmala & Muralikrishna, 2003) mientras que amilasa del insecto *H. dromedarii* cuenta con un peso de 106 kDa (Mohamed, 2000); se ha reportado un peso molecular de α -amilasa extraída de *Zea Mays L.* correspondiente a 67.4 kDa, en este caso la purificación de la enzima se llevó a cabo mediante una precipitación fraccionada empleando la técnica cromatográfica de adsorción de lecho expandido (Biazus, et al., 2009); por otra parte y variando según la especie, su punto isoeléctrico se encuentra entre 4.1-5.7 (Aljabi, 2014).

Como es bien conocido, todos los sistemas biológicos y químicos son altamente sensibles a variaciones de factores externos como la variación de concentración de sustrato, de concentración de enzima, el pH, la temperatura y la presencia de inhibidores o activadores, que

pueden llegar a determinar la velocidad inicial de reacción, esto indica que dichas variables se pueden ignorar únicamente en un tiempo igual a cero en la reacción. Con respecto al efecto de la variación de la concentración de enzima, en condiciones normales, si en la solución se encuentran dos moléculas de enzima que actúan cada una de forma independiente, transformarán entonces en un tiempo determinado el doble de la cantidad de sustrato correspondiente a una molécula de enzima actuando, es por ello que la velocidad de reacción se comporta de forma proporcional a la concentración de enzima presentando consigo un comportamiento lineal, $v = k[E]$ (Dixon & Webb, 2014).

En relación con la temperatura, se considera una de las variables más significativas en cualquier proceso bioquímico, ya que gracias a ella las velocidades de reacción pueden aumentar o disminuir, incluso hasta el punto de desactivación de la enzima por efecto de su desnaturalización (punto en el que la temperatura supera la temperatura de estabilidad), es por esto que se espera que dicha variable tenga grandes repercusiones en la reacción enzimática catalizada por α -amilasa, lo anterior es la razón por la que todas las enzimas dentro de su caracterización presentan valores de temperatura óptima, la cual corresponderá a aquella a la que la enzima demuestre su valor máximo con respecto a la actividad enzimática, esta no se debe confundir con la temperatura de estabilidad, 30°C para α -amilasa extraída de *Zea Mays*, ya que no está ligada a su actividad enzimática sino que indica la temperatura a la que la enzima logra retener su actividad y funcionalidad a lo largo del tiempo; varios estudios han reportado que la temperatura óptima para la enzima proveniente de cereales está alrededor de 50°C (Aljabi, 2014), sin embargo, de forma más específica para α -amilasa del maíz se ha encontrado que puede establecerse alrededor de los 70°C o más, (Dixon & Webb, 2014) alcanzando incluso los 90°C (Biazus, et al., 2009).

Por su parte, y debido a que la enzima α -amilasa es un polímero conformado por varios iones, el pH de la solución en la que se encuentre afectará de manera positiva o negativa su actividad enzimática, es por esta razón también que cada enzima tiene relacionado un pH característico (pH óptimo) para el cual evidencia los valores más altos de actividad enzimática, sin embargo un cambio brusco de la enzima a pH muy bajo o muy alto dará como resultado la desnaturalización de la misma; para α -amilasa el pH óptimo varía entre 4.0-6.5 y estará sujeto a su fuente de obtención (Aljabi, 2014).

Con respecto a los parámetros cinéticos, han sido ampliamente estudiados y reportados, sin embargo, es indispensable aclarar que la obtención de los valores está subordinada por el método empleado desde su extracción y purificación hasta la evaluación; por lo que se presentan variaciones en las cantidades referenciadas. De acuerdo con cómo se desarrolla y estudia la cinética enzimática a partir de la variación de concentración de sustrato, la cual cuenta con más detalle en la sección posterior, se definen: la constante de Michaelis (K_m) como la concentración de sustrato a la que la velocidad de la reacción actual (V_o) corresponde a la mitad de $V_{m\acute{a}x}$ ($V_{m\acute{a}x}/2$); esta constante indica la afinidad (o desligamiento) de la enzima por el sustrato (Tomasik & Horton, 2012). A su vez la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) determinada como el mayor recambio posible en las condiciones experimentales (Roskoski, 2015), particularmente para α -amilasa extraída de *Zea Mays L* se obtienen los valores consignados en la tabla 2, estos fueron obtenidos mediante el método de linealización de Lineweaver-Burk y evaluados tomando como sustrato de la enzima, el almidón.

Tabla 2*Constantes cinéticas de α -amilasa de Zea Mays L.*

Estudio	Km		Vm _{máx}	
	Unidades reportadas	Unidades presentadas	Unidades reportadas	Unidades presentadas
(Biazus et al.,2009)	7.69×10^{-2} g/L	4.26×10^{-4} mol/L	7.69×10^2 g/Lmin	4.27 mol/Lmin
(Aljabi,2016) ^a	6.71×10^{-3} g/mL	1.86×10^{-2} mol/L	0.190 μ mol/Lmin	1.90×10^{-4} mol/Lmin
(Aljabi,2016) ^b	5.71×10^{-3} g/mL	9.71×10^{-3} mol/L	0.361 μ mol/Lmin	3.60×10^{-4} mol/Lmin

Nota. ^a constantes cinéticas promedio para cultivares de maíz en estado maduro en el 2010. ^b constantes cinéticas promedio para cultivares de maíz en estado maduro en el 2011.

3.3.5. Cinética enzimática

La actividad catalítica de una enzima se mide en términos de la tasa de conversión catalizada, no de la tasa de reacción; en el sentido fisicoquímico, la unidad para la tasa de reacción es moles por litro por segundo (Ms^{-1}), mientras que para las reacciones catalizadas por enzimas se define por la unidad moles por segundo (esta cantidad se denomina katal (kat)). La actividad se ha expresado hasta ahora en unidades de micro moles (μmol) por minuto (unidad (U) o unidad internacional (UI)). Una unidad (UI) es $16,67 \times 10^{-9}$ kat = 16,67 nkat. En la medición de la actividad enzimática, siempre se utiliza una concentración de sustrato elevada que supera ampliamente el valor de Km, y la muestra de enzima que se va a investigar se diluye de forma correspondiente; en estas condiciones, la velocidad de la reacción catalizada por la enzima sólo depende de la concentración de enzima, es decir, se trata de una reacción de orden cero. Incluso en condiciones de saturación del sustrato, las actividades catalíticas medidas se ven influidas por ligeras diferencias en las condiciones de reacción, como la temperatura, la composición y la concentración del tampón, el valor del pH, la naturaleza del sustrato y su concentración, las coenzimas y el contenido de proteínas en la muestra. Por lo tanto, los resultados de la medición de la actividad

catalítica de una enzima dependen en principio del método; la comparación directa de los resultados entre laboratorios se ve dificultada por el uso de diferentes métodos en distintos laboratorios (Kiba, 2005).

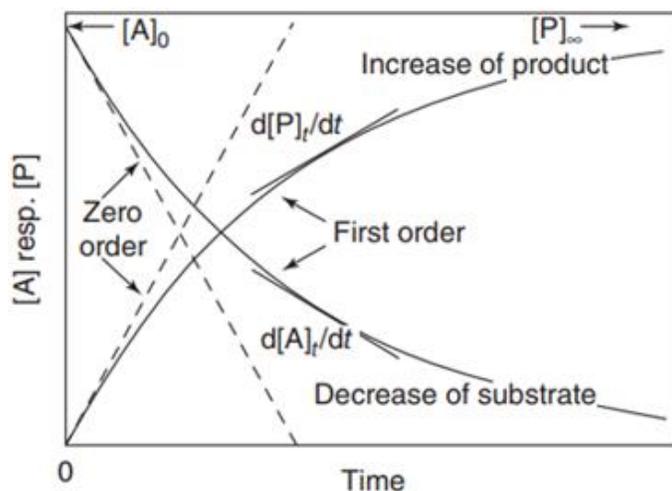
Con el fin de comprender el mecanismo de acción de las enzimas, normalmente se utilizan diversos métodos, por medio de la estructura terciaria de la proteína, la química de proteínas clásica y por métodos modernos de mutagénesis dirigida; sin embargo, el método más antiguo para estudiar mecanismos de reacción enzimáticos consiste en la determinación de velocidad de la reacción y del modo en que ésta cambia en respuesta a cambios en los parámetros cinéticos; lo cual se conoce como cinética enzimática (Lehninger, 2009). La cinética enzimática está restringida a las enzimas y su estudio comienza observando el sustrato de la enzima y su conversión en producto; por lo cual, se ocupa de las reacciones enzimáticas dependientes del tiempo fuera del equilibrio; en otras palabras, el equilibrio y la cinética se complementan, ya que el equilibrio cubre áreas de la cinética como el proceso de unión inicial que precede al paso catalítico y la cinética, proporciona información sobre los procesos de unión (Bisswanger, 2017).

Para estudiar la cinética es requisito previo conocer el orden de la reacción química, siendo este definido como la potencia de la concentración de los componentes incluida en la ecuación de velocidad (Carbonero, 1976), esto con el fin de conocer la influencia de los reactivos presentes en la determinación de la velocidad de reacción. Cuando se estudian las reacciones catalizadas por enzimas, se observa un comportamiento de una reacción de orden cero y una reacción de primer orden (Figura 8). En la reacción de primer orden, la velocidad de reacción V puede determinarse por la disminución del sustrato o el aumento del producto en función del tiempo. Por el contrario, en una reacción de orden cero, la velocidad de reacción viene dictada únicamente por la cantidad de catalizador que permanece inalterada durante la reacción, independientemente de la

concentración del sustrato; en este caso, la progresión lineal de la disminución de sustrato o formación del producto es indicativa de orden cero y la pendiente da la constante de velocidad de orden cero (Bisswanger, 2017).

Figura 8

Curva de progreso de reacciones de orden cero y primer orden.



Nota. En una reacción de primer orden, la velocidad de reacción (V) se puede determinar ya sea, teniendo en cuenta el aumento de producto [P] o la disminución de sustrato [A] en función del tiempo, mientras que en una reacción de orden cero, la velocidad de reacción (V) es independiente de [A] y está sujeta únicamente a la cantidad de catalizador (que permanece constante durante la reacción). Adaptado de *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*, por H. Bisswanger, 2017, Wiley VCH, <https://doi.org/10.1002/9783527806461.ch3>.

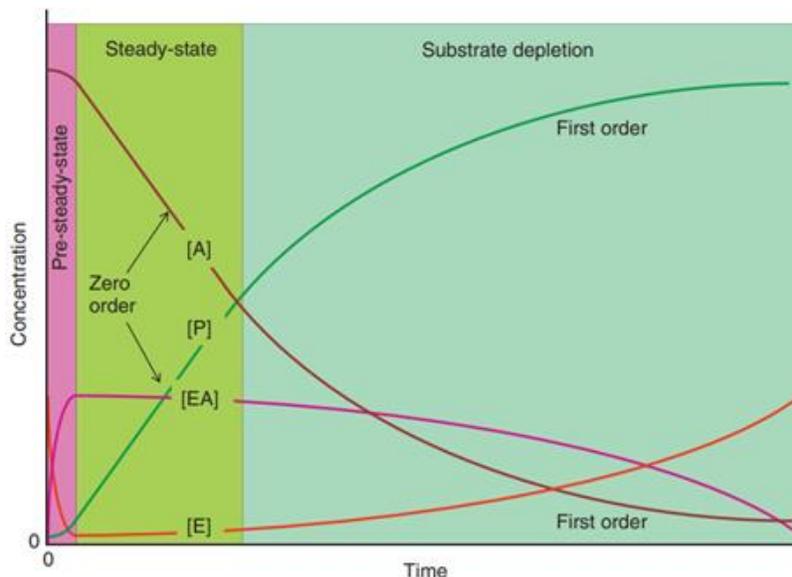
Teniendo en cuenta que el mecanismo de una reacción enzimática irreversible, con la conversión de un único sustrato en producto, está definido como se muestra en la ecuación 1, se presentan tres constantes de (Najafpour, 2015): K_1 , para la formación del complejo [EA]; K_{-1} , para la reacción reversible del complejo [EA] y K_2 , para la formación del producto.



La variación de los reactivos individuales dependientes del tiempo se presenta en tres fases (Figura 9): 1) fase inicial rápida (preestado estacionario) en donde el complejo [EA] se forma instantáneamente, disminuye la enzima libre, la tasa de rotación y la formación de productos son bajas. 2) fase media (estado estacionario) en la cual, la tasa de rotación es más alta, manteniéndose la concentración del complejo [EA] constante; en esta fase, tanto la disminución del sustrato como la formación del producto proceden de forma lineal (orden cero); a su vez, puede considerarse como un estado de cuasi-equilibrio; por lo tanto, en contraste con un verdadero equilibrio, se le llama estado estacionario. 3) fase de agotamiento en la que finalmente el sustrato se agota, el complejo [EA] decae y la tasa de rotación disminuye, hasta llegar a cero. La duración de las 3 fases depende de los valores de las tres constantes de velocidad de la reacción (Bisswanger, 2017).

Figura 9

Variaciones dependientes del tiempo de una reacción enzimática irreversible.



Nota. Constituido por tres fases que se encabezan por la fase inicial rápida también conocido como pre-estado estacionario (región rosada), el complejo [EA] se forma instantáneamente (línea fucsia), mientras que la enzima libre

disminuye (línea naranja), la tasa de rotación y la formación de productos (línea verde) son bajas. Luego, en la fase media más conocida como estado estacionario (región verde), la tasa de rotación es más alta, la concentración del complejo [EA] permanece casi constante (línea fucsia); por último, en la fase de agotamiento (región aguamarina), el sustrato se agota (línea vinotinto), el complejo [EA] decae (línea verde) y la tasa de rotación disminuye hasta llegar a 0. Adaptado de *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*, por H. Bisswanger, 2017, Wiley VCH, <https://doi.org/10.1002/9783527806461.ch3>.

Experimentalmente, las constantes de velocidad individuales no son directamente accesibles; por lo tanto, la ecuación de Michaelis-Menten, derivada de la teoría del estado estacionario, ha sido ampliamente utilizada debido a que describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas (Lehninger, 2009). En la aplicación de la misma, las constantes de velocidad quedan expresadas por medio de dos constantes cinéticas como se observa en la ecuación 3; la constante de Michaelis, K_m , que tiene las tres constantes de velocidad y la velocidad máxima, $V_{m\acute{a}x}$, definida como el mayor recambio posible en las condiciones experimentales (Roskoski, 2015).

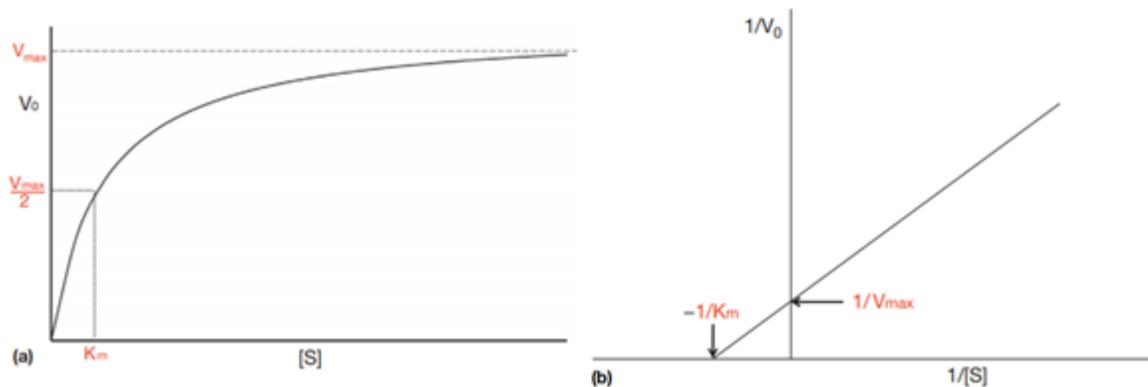
$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EA] = \frac{k_2[E]_2[A]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [A]} \rightarrow v = \frac{V[A]}{K_m + [A]} \quad (2)$$

Según la ecuación de Michaelis-Menten, la dependencia de la velocidad de reacción V con respecto a la concentración de sustrato $[A]$ es una curva de saturación hiperbólica pudiendo obtenerse $V_{m\acute{a}x}$ por extrapolación y K_m por medio de la concentración de sustrato a la que V_0 es la mitad de $V_{m\acute{a}x}$ (Figura 10.a); sin embargo, es ampliamente utilizada la ecuación de Lineweaver-Burk, ya que permite la transformación lineal simple de la ecuación de Michaelis-Menten, en donde las constantes cinéticas pueden derivarse directamente de los interceptos de los ejes o de la pendiente de la línea recta (Figura 10.b) (Talens, et al., 2016). Por lo tanto, en la experimentación, suele ser más conveniente determinar las velocidades iniciales, V_0 , por medio de la tangente para

$t=0$ de las curvas de progreso de la reacción y, por consiguiente, utilizar la ecuación de Lineaweaver-Burk para conocer las constantes cinéticas (Carbonero, 1976).

Figura 10

Cinética de Michaelis-Menten.



Nota. a) Diagrama directo de la representación de la ecuación de Michaelis-Menten; se observa un aumento pronunciado a bajas cantidades de sustrato, que se vuelve un poco más lento conforme aumenta la concentración del mismo, alcanzando la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) en la saturación. En $V_{m\acute{a}x}/2$ la concentración del sustrato se hace igual al valor de K_m . b) Gráfico de Lineweaver-Burk de la cinética de Michaelis-Menten; en el cual, el intercepto en eje x ($y=0$) corresponde a $-1/K_m$ y el intercepto con el eje y ($x=0$) representa a $1/V_{m\acute{a}x}$. Adaptado de *Enzymes: Functions and Characteristics*, por D. Talens, et al., 2016, *Encyclopedia of Food and Health*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00256-7>.

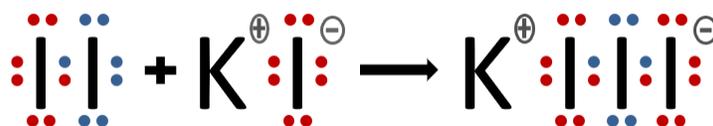
3.4. Prueba de Lugol

El reactivo de Lugol es una disolución de yodo con yoduro de potasio en agua; su nombre se debe a que Jean Guillaume Auguste Lugol fue quien descubrió que el yodo (I_2), el cual es parcialmente soluble en agua, sin embargo, en presencia de iones yoduro (I^-) aumenta su hidrosolubilidad, por lo que se disuelve completamente añadiendo yoduro de potasio (KI). Su obtención es un claro ejemplo de solubilidad de una sustancia en agua según su enlace químico.

La molécula de yodo, I_2 , está formada por dos átomos de yodo que se encuentran unidos por un enlace covalente y, como consecuencia de su carácter apolar, el yodo es prácticamente insoluble en agua. El yoduro de potasio hace soluble al yodo diatómico molecular en agua, debido a la formación de iones triyoduro, I_3^- e iones potasio, K^+ (Figura 11); lo cual, se evidencia por la coloración rojiza de la disolución (Martín-Sánchez, et al., 2013).

Figura 11

Reacción de yodo molecular (I_2) con yoduro de potasio (KI).



Nota. Reacción iónica entre el yodo molecular I_2 y el yoduro de potasio (KI) dando lugar a I_3^- (Soluble en agua).

Adaptado de *Reactivo de Lugol: Historia de su descubrimiento y aplicaciones didácticas*, por M. Martín-Sánchez, 2013, *Educación Química*, [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)73192-6](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)73192-6).

Entre las aplicaciones asociadas al reactivo de Lugol, se encuentra la formación de complejos entre el yodo y la estructura de algunos polímeros; entre ellos, el primer complejo polimérico descubierto en 1814, fue el complejo yodo-almidón, en el cual los poliyoduros (I_n^-) ($n=3,5,9\dots$), principalmente I_3^- e I_5^- , interactúan con el almidón, resultando un color característico azul oscuro (Moulay, 2013), por lo tanto, se emplea como prueba cualitativa y cuantitativa de almidón (El-Fallal, et al., 2012). El color producido, está sujeto al grado de polimerización y se debe en su mayoría, a la interacción del yodo con cadenas de amilosa con un grado de polimerización superior o igual a 47 (47 unidades de glucosa) (Visvanathan, et al., 2020), formándose el complejo yodo-amilosa, debido a la inserción de los poliyoduros en la estructura helicoidal de la misma y dispuestos de forma lineal, paralelo al eje helicoidal (El-Fallal, et al., 2012); por otra parte, el yodo puede unirse considerablemente a la amilopectina cuando su

estructura tiene un grado de polimerización superior a 30 (30 unidades de glucosa), apareciendo el complejo yodo-amilopectina de color púrpura-rojizo; por lo tanto, la afinidad del yodo hacia la amilosa es de aproximadamente el 20% y <1% hacia la amilopectina (Moulay, 2013).

El complejo yodo-amilosa, presenta su máximo de absorción alrededor de 650 nm; de todas formas, el máximo de absorción se desplaza hacia longitudes de onda más cortas (menores) y la longitud de la cadena resonante producida se acorta, al aumentar la concentración de yoduro en el reactivo, esto es derivado de la ruptura de las cadenas largas de poliyoduro por la adición de iones I^- ; a su vez, aunque el color azul oscuro desarrollado por el complejo yodo-amilosa y el púrpura rojizo del complejo yodo-amilopectina, son causados principalmente por el poliyoduro I_5^- e I_3^- , respectivamente, poliyoduros de mayor tamaño (I_9^{3-} , I_{11}^{3-} , I_{13}^{3-} , I_{15}^{3-}) también son absorbidos por el polímero, en un porcentaje muy bajo, cuando la concentración de yoduro es baja; sin embargo, la formación del complejo yodo-almidón es favorecida por altas concentraciones de yoduro, debido a que aumenta la relación entre los iones de yoduro y las moléculas de yodo hasta ser al menos igual a uno, siendo $(I_3^-)_n$; por lo tanto, las cadenas de iones I_3^- son el cromóforo en el complejo azul yodo-almidón (Moulay, 2013).

La naturaleza de la interacción yodo-almidón es extremadamente compleja, es posible que sea a través de las fuerzas dipolares, y no entre el yodo y el átomo de oxígeno de la amilosa, ya que las fuerzas dipolares volverían rígida la estructura helicoidal de la molécula aumentando la viscosidad intrínseca. (Moulay, 2013). A su vez, el complejo yodo-almidón forma tres tipos de estructura; las superhélices, asociadas a la inserción del yodo de manera lineal en las hélices del almidón, las redes fibrosas sueltas y los agregados, en los cuales, se encuentra involucrada la amilopectina en la reacción (Xiao, et al., 2006).

Al romper o hidrolizar el almidón en unidades más pequeñas de carbohidrato, el color azul oscuro del complejo yodo-almidón desaparece; de modo que, la prueba de Lugol puede utilizarse para controlar el progreso de la retrogradación del almidón (Wang, et al., 2015) y determinar el final de una hidrólisis (Holló & Szejtli, 1957); por lo tanto, se ha utilizado como un método amiloclástico para determinar la actividad de α -amilasa, con el cual, se evalúa la cantidad de almidón consumido en la reacción enzimática mediante la cuantificación del almidón no reaccionado en el medio de ensayo, debido a que cuando actúa la α -amilasa sobre el almidón, el tamaño de la cadena de amilosa disminuye, reduciendo el tamaño del complejo yodo-almidón y, por consiguiente, la intensidad azul del complejo; en consecuencia, la reducción de la intensidad del color azul se considera proporcional a la actividad de α -amilasa (Visvanathan, et al, 2020).

La prueba de Lugol es frecuentemente utilizada, debido a que no implica un paso de calentamiento, en comparación con los métodos de azúcares reductores (Visvanathan, et al., 2020), es considerado el método más sensible (Karim, et al., 2000) y es sencillo ya que consta comúnmente de seis pasos: 1) adición de la enzima y el almidón en un tubo de ensayo; 2) adición de ácido clorhídrico para detener la reacción; 3) adición de agua destilada; 4) adición de una solución $I_2:KI$; 5) transferencia de la mezcla de reacción a una placa de microtitulación; 6) medición de la absorbancia. Aun así, los ensayos de la prueba de Lugol son bastantes diversos, debido a que varía la preparación de la solución $I_2:KI$, la formación del complejo yodo-almidón y la medición del color a diferentes longitudes de onda (Visvanathan, et al., 2020).

A pesar de sus ventajas, la prueba de Lugol presenta limitaciones debido a la interferencia causada por las sustancias reductoras del I_2 presentes en la muestra; por otra parte, como el complejo yodo-almidón forma un color azul intenso, plantea dificultades para optimizar la lectura de control y la medición de un cambio relativamente pequeño en la absorbancia, siendo necesario

utilizar diluciones de los ensayos. Adicionalmente, dado que el color del complejo cambia en función del tamaño de la cadena de dextrina, la intensidad del color producido depende de la composición de maltodextrinas de la muestra, lo cual puede causar la obtención de resultados erróneos (Visvanathan, et al., 2020).

3.5. Método de Bradford

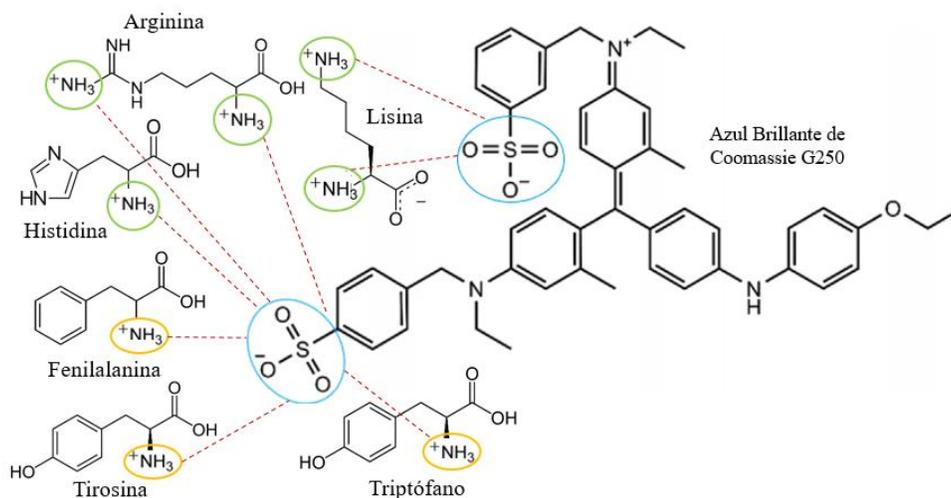
El método colorimétrico de Bradford descrito en primer lugar por Marion M. Bradford en 1976, es un método que permite la detección y cuantificación de proteínas; está basado en la interacción electrostática e hidrofóbica que se desarrolla entre el colorante Azul Brillante de Coomassie G250 y los residuos aminoacídicos pertenecientes a la proteína (Kruger, 2009) en condiciones de pH ácido (Noble & Bailey, 2009); entre los residuos más afines al colorante se encuentran los aromáticos y básicos como: arginina, lisina (Kruger, 2009), histidina, fenilalanina, triptófano y tirosina, dicha especificidad da lugar a una amplia variación en la respuesta de las proteínas en el ensayo lo que se traduce en una desventaja del método, a pesar de ello resulta muy útil conocer la concentración inicial de proteínas de la que se parte, para la evaluación de la actividad enzimática de la enzima.

El colorante existe en tres formas iónicas cargadas durante el ensayo, dos formas catiónicas que se presentan en la primera parte, una de coloración roja y otra de coloración verde con máximos de absorción a longitudes de onda de 470 nm y 650 nm respectivamente; debido a esto, el reactivo de Bradford presenta su coloración marrón-naranja. En la finalización del ensayo se muestra en su forma aniónica doblemente protonada que corresponde a un color más azul del reactivo, esta forma es la responsable de enlazar a la proteína dando lugar así a un desplazamiento metacromático hacia los 590-595 nm; los detalles de la interacción colorante-proteína no se conocen con claridad. Sin embargo, estudios han determinado de forma empírica que se requieren

péptidos de al menos nueve residuos o más que contengan residuos básicos o aromáticos para observar el desarrollo del color al interactuar con el colorante Azul de Coomassie G250 (Copeland, 1994) (Kruger, 2009), además se ha informado que la interacción colorante-proteína está determinada por interacciones electrostáticas entre los grupos sulfonato y los residuos aminoacídicos básicos mencionados anteriormente (Figura 12) (Brady & Macnaughtan, 2015). Debido a cómo se desarrolla el método, no se puede asegurar que la respuesta obtenida corresponde a un dato que refleje la cantidad exacta de una enzima, ya que si existe una gran variedad de proteínas en solución que reaccionan bajo el mismo mecanismo, puede caerse en una sobreestimación de la concentración de la proteína, además por la naturaleza de la interacción colorante-proteína, se verá influida por otras interacciones electrostáticas de los grupos sulfonato con los residuos básicos mencionados anteriormente (Kruger, 2009).

Figura 12

Interacción química asociada al método de Bradford.



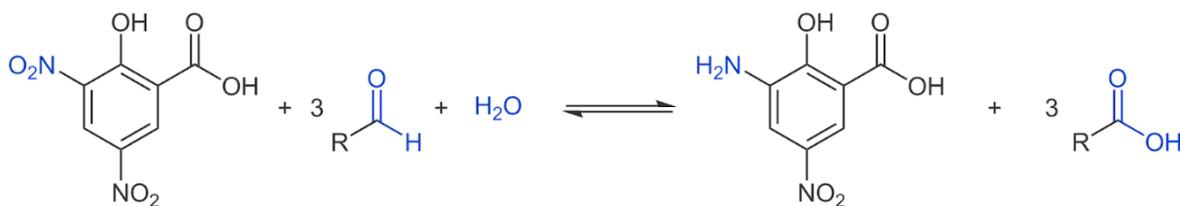
Nota. Ilustración de los grupos funcionales de los residuos aminoácidos (residuos básicos en verde, residuos aromáticos en naranja) que interactúan electrostáticamente (en rojo) con los grupos sulfonato del colorante Azul Brillante de Coomassie (en azul), componente principal del reactivo Bradford.

3.6. Método de DNS

El método del ácido 3, 5-dinitrosalisílico, conocido por su abreviatura como método DNS, es uno de los métodos de azúcares reductores mayormente empleados para la medición de actividad enzimática, particularmente de α -amilasa; el principio básico del método consiste en la reacción de reducción del aromático del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) con el extremo carbonilo de los azúcares reductores dando como resultado la formación del ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (ANS) de color naranja intenso, que absorbe fuertemente la luz a 540 nm (Figura 13), es decir los grupos funcionales (aldehído/cetona) de los azúcares se oxidan simultáneamente a sus respectivos ácidos carboxílicos. Así, teóricamente, la cantidad de ANS producido debería ser directamente proporcional al número de grupos funcionales oxidados en el azúcar. Sin embargo, se ha encontrado que diferentes azúcares dan lugar a diferentes intensidades de color, lo que indica que no hay equivalencia entre la cantidad de azúcar que reacciona y la cantidad de ANS producidos (Visvanathan, et al., 2020).

Figura 13

Reacción química asociada al método DNS.



Nota. Reacción de oxidación/reducción; reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino 5-dinitrosalicílico por acción de los extremos reductores de unidades de glucosa (agentes reductores). Adaptado de *How We Approached Glycogen Characterization*, The International Genetically Engineered Machine (iGEM), 2015, <http://2015.igem.org/Team:Aachen/Lab/Glycogen/Characterization>.

4. Metodología

4.1. Estandarización del método de Lugol

4.1.1. Ensayos preliminares

Inicialmente, se prepararon: a. Soluciones de I₂:KI (reactivos de Lugol) a diferentes concentraciones y proporciones, entre sí (ver Apéndice A); b. Soluciones de almidón (al 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 %p/v) y, c. Soluciones de complejo yodo-almidón entre los diferentes reactivos de Lugol y las soluciones de almidón preparadas anteriormente. En base a las observaciones realizadas, se definieron los siguientes ensayos:

Ensayo 1: Se realizaron muestras que contenían 10, 25, 50 y 100 μ L de solución de I₂:KI (0,4 %p/v de I₂ y 4 %p/v de KI; proporción 1:10) y un volumen restante correspondiente a la solución de almidón al 0,01 % p/v completando así un volumen total de 3 mL por muestra (Tabla 3); esto con el fin de establecer el volumen de la solución de I₂:KI a añadir para la formación del complejo yodo-almidón.

Ensayo 2: Se realizaron muestras que contenían: 2,990 mL de solución de almidón al 0,005, 0,01, 0,025 y 0,05 %p/v y 10 μ L de solución de I₂:KI (0,4 %p/v de I₂ y 4 %p/v de KI; relación 1:10) completando así un volumen total de 3 mL (Tabla 4); esto con el fin de definir la solución de almidón a utilizar en el posterior estudio del reactivo de Lugol.

Tabla 3

Volumen de solución I₂:KI para la formación del complejo yodo-almidón.

Muestra	Solución I₂:KI (μL)	Agua tipo I (mL)	Solución almidón 0.01 % p/v (mL)	Volumen final (mL)
Blanco	-	3	-	3
1	10	-	2.990	3
2	25	-	2.975	3
3	50	-	2.950	3
4	100	-	2.900	3

Tabla 4

Concentración de las soluciones de almidón para la formación del complejo yodo-almidón.

Muestra	Solución I₂:KI (μL)	Agua tipo I (mL)	Solución almidón (% p/v)	(mL)	Volumen final (mL)
Blanco		3	-	-	3
1	10	-	0.005	2.990	3
2	10	-	0.01	2.990	3
3	10	-	0.025	2.990	3
4	10	-	0.05	2.990	3

Cada muestra se realizó por triplicado, se midió el espectro electromagnético en un rango de 200 nm a 800 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu, y se graficó el promedio de los resultados.

4.1.2. Estudio del reactivo de Lugol

Teniendo en cuenta que entre I₂:KI la proporción mínima a la que se solubiliza el yodo en la solución es 1:5 en % p/v, se prepararon tres soluciones de I₂:KI manteniendo dicha relación,

pero variando las concentraciones de los reactivos en la solución I₂:KI, que se llevaron a un volumen final de 2 mL (Tabla 5).

Tabla 5

Concentración de I₂ y KI en la solución I₂:KI en relación 1:5.

Muestra	I ₂ (mol)	KI (mol)	I ₂ (% p/v)	KI (% p/v)	Proporción (% p/v)	Concentración de yodo (M)
1	7.90x10 ⁻⁵	6.20x10 ⁻⁴	1.00	5.15	1:5	0.349
2	1.58x10 ⁻⁴	1.25x10 ⁻³	2.05	10.3	1:5	0.704
3	2.45x10 ⁻⁴	1.81x10 ⁻³	3.10	15.0	1:5	1.027

Posteriormente, se plantearon dos experimentos para evaluar cual, de los dos reactivos, que componen la solución I₂:KI, sería el determinante en la detección de almidón en la muestra. En el primer experimento, se prepararon soluciones de I₂:KI, variando la cantidad de KI y manteniendo constante la cantidad de I₂ (Tabla 6). En el segundo experimento, se realizaron soluciones de I₂:KI, variando la cantidad de I₂ y manteniendo constante la cantidad de KI (Tabla 7). Cada solución de I₂:KI se llevó a un volumen final de 5 mL.

En cada caso, se realizaron las muestras adicionando 2.990 mL de solución de almidón al 0,01 %p/v y 10 μ L de solución I₂:KI completando así un volumen final de 3 mL; cada muestra se realizó por triplicado, se tomó el espectro en un rango de 200 a 800 nm, tomando como blanco una solución 2,99 mL de agua tipo I y 10 μ L de cada uno de los reactivos y se graficó el promedio de las tres réplicas.

Tabla 6*Variación de la concentración de KI en la solución I₂:KI.*

Muestra	I ₂ (mol)	KI (mol)	I ₂ (% p/v)	KI (% p/v)	Proporción (% p/v)	Concentración de yodo (M)
1	8,30x10 ⁻⁵	1,22x10 ⁻³	0.40	4	1:10	0,261
2	8,30x10 ⁻⁵	2,40x10 ⁻³	0.40	8	1:20	0,497
3	8,30x10 ⁻⁵	3,62x10 ⁻³	0.40	12	1:30	0,740
4	8,30x10 ⁻⁵	4,80x10 ⁻³	0.40	16	1:40	0,977
5	8,30x10 ⁻⁵	6,04x10 ⁻³	0.40	20	1:50	1,22

Tabla 7*Variación de la concentración de I₂ en la solución I₂:KI.*

Muestra	I ₂ (mol)	KI (mol)	I ₂ (% p/v)	KI (% p/v)	Proporción (% p/v)	Concentración de yodo (M)
1	3.95x10 ⁻⁵	3.01x10 ⁻³	0.20	10.0	1:50	0.610
2	1.19x10 ⁻⁴	3.02x10 ⁻³	0.60	10.0	1:17	0.628
3	2.02x10 ⁻⁴	3.02x10 ⁻³	1.00	10.0	1:10	0.644
4	2.88x10 ⁻⁴	3.00x10 ⁻³	1.50	10.0	1:7	0.658
5	3.71x10 ⁻⁴	3.02x10 ⁻³	1.90	10.0	1:5	0.678

4.1.3. Curva de calibración del método de Lugol

Se seleccionaron tres soluciones de I₂:KI que contenían: 0.6%p/v I₂ y 10%p/v KI, 1%p/v I₂ y 10%p/v KI, 1.5%p/v y 10%p/v KI; se utilizó cada una de ellas para realizar una curva de calibración, con el objetivo de estudiar el posible comportamiento lineal y determinar la solución de I₂:KI que se empleó posteriormente como el reactivo de Lugol. Para las curvas de calibración

se utilizaron soluciones patrón de almidón a concentraciones 0,0025, 0,005, 0,0075, 0,01 %p/v preparadas de una solución madre al 0,02 %p/v (Tabla 8). Las muestras se prepararon como se muestra en la Tabla 9, por triplicado y se midió su absorbancia a 570 nm.

Tabla 8

Patrones para la curva de calibración del método de Lugol.

Muestra	Solución almidón 0.02% p/v (mL)	Agua tipo I (mL)	Volumen final (mL)	Concentración de almidón (% p/v)
1	0.625	4.375	5	0,0025
2	1.250	3.750	5	0,005
3	1.875	3.125	5	0,0075
4	2.500	2.500	5	0,01

Tabla 9

Curva de calibración del método de Lugol.

Patrón	Solución almidón (mL)	Agua tipo I (mL)	Solución I ₂ :KI (μ L)	Concentración de almidón (% p/v)
Blanco	-	2.990	10	0.0000
1	2.990 (Muestra 1)	-	10	0,0025
2	2.990 (Muestra 2)	-	10	0,0050
3	2.990 (Muestra 3)	-	10	0,0075
4	2.990 (Muestra 4)	-	10	0,0100

4.1.4. Análisis estadístico

Los ensayos preliminares fueron sometidos a un tratamiento estadístico que consistió en determinar la media y desviación estándar para cada grupo de datos; por otra parte, en los estudios

del reactivo de Lugol se realizó la verificación de varianza, prueba de normalidad, análisis estadístico de ANOVA simple para un factor y gráfica de medias y 95,0% de Fisher LSD, empleando el programa *Statgraphics*.

4.2. Extracción del extracto enzimático de semillas de *Zea Mays L*

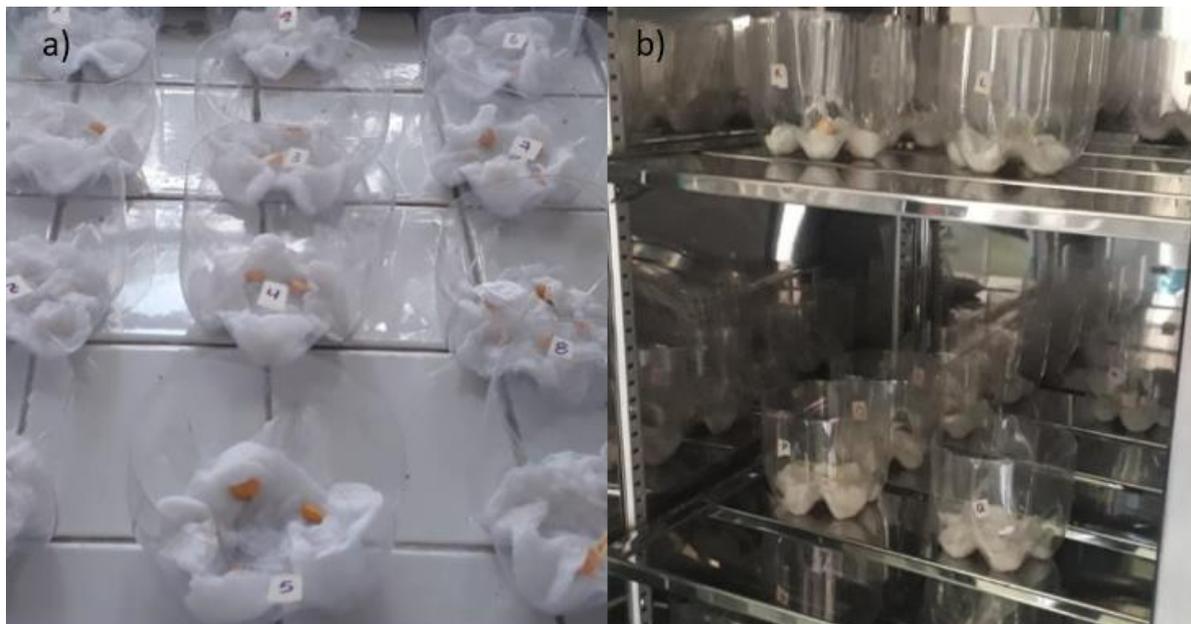
4.2.1. Montaje y germinación de las semillas

Los granos de *Zea Mays L* se obtuvieron de la compra de un kilo de maíz ICA V-305 (amarillo) de la marca semillas RBC S.A.S, con registro ICA distribuidor: 1233/12022019, pureza del 95% y germinación del 85%; se almacenaron en su empaque original a temperatura ambiente. Inicialmente se seleccionaron grupos de cinco semillas con características físicas similares tales como apariencia, tamaño y peso, este último se registró para cada agrupación. Cada grupo de semillas se sometieron a un proceso de hidratación durante seis horas con 10 mL de agua tipo I y tres gotas de una solución de hipoclorito de sodio al 5% en tubos de centrifuga cónicos falcon de 50 mL; posteriormente, se registró nuevamente el peso de cada grupo y se procedió a determinar el porcentaje de hidratación correspondiente (ver Apéndice B).

Por consiguiente, haciendo uso de una cámara climatizada FARFLOW® de Farmoquing S.A.S, previamente desinfectada, se fijaron las siguientes condiciones: temperatura; 24°C±1°C, humedad; 80%±5% en ausencia de luz; para cada agrupación de semillas se realizó un montaje en recipientes de plástico, a los cuales se les realizó anticipadamente una limpieza con etanol absoluto y dos lavados con agua tipo I; cada montaje contenía aproximadamente 3 gramos de algodón quirúrgico hidratado con 40 mL de agua tipo I y sobre él, se acomodaron las 5 semillas de *Zea Mays L* (Figura 14.a); por último, se colocaron los montajes en la cámara climatizada y se les permitió germinar durante cuatro días (Figura 14.b).

Figura 14

Montaje de germinación para semillas de Zea Mays L.



Nota: a) Montaje en recipientes de plástico de las semillas de *Zea Mays L.* b) Montajes en la cámara climatizada. Las semillas germinaron al cuarto día.

4.2.2. Obtención del extracto crudo que contenía α -amilasa

Una vez transcurridos los cuatro días de germinación para cada montaje, se removieron los recipientes de la cámara climatizada FARFLOW®; posterior a esto, se separaron las plántulas de las semillas sin germinar hasta entonces, y a cada plántula se le retiraron las raíces (radicular y seminales laterales), coleóptilo y el mesocotilo, para ser utilizado el grano en la extracción, debido a que en el endospermo se encuentran contenidas las proteínas (Bewley, et al., 2013). Se registró el peso de los granos germinados (Ver apéndice B), y con base en él se calcularon los mL a utilizar de buffer fosfato 0,1 M, pH 6, tomando como base de cálculo que por cada 3 g de los granos germinados se agregan 25 mL de buffer fosfato, teniendo presente que el volumen de buffer de

extracción al variar podría hacer más o menos concentrado el extracto crudo con respecto a la cantidad de proteínas; en seguida, en un mortero de porcelana y con ayuda del buffer fosfato 0.1M, pH 6 se maceró el endospermo; el extracto obtenido se filtró usando una doble capa de gasa estéril en un embudo de vidrio para retirar los residuos vegetales; posteriormente, el extracto se almacenó en tubos de centrifuga cónicos falcon de 50 mL durante 24 horas en el congelador a 4 °C con el fin de precipitar por efecto de gravedad el almidón que se encuentra presente también en el endospermo del grano de maíz. Al cabo de un día los extractos se cambiaron de tubo y se llevaron a centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, se procedió a reenvasar el extracto en otro tubo para llevar nuevamente a centrifugación, pero esta vez a 10000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Thermo Scientific™ IEC™ CL31 Multispeed. Finalmente, el extracto se filtró a través de un filtro de jeringa hidrófilo PVDF de 13 mm 0,22 μ m, con anillo exterior, para obtener un extracto enzimático libre de almidón.

4.3. Método de Bradford

Con el objetivo de determinar la concentración de proteínas en el extracto crudo, se realizó la preparación del reactivo de Bradford y se aplicó el método de Bradford, utilizando Albúmina de Suero Bovino (BSA) como proteína estándar. Los patrones se prepararon a partir de una solución madre de BSA 2.0 mg/mL (Tabla 10) y la curva de calibración se realizó como se describe en la Tabla 11. Se midió la absorbancia a 595 nm para cada patrón por triplicado, y una vez elaborada, se realizó la medición de la muestra por triplicado.

Tabla 10*Patrones para la curva de calibración del método de Bradford.*

Muestra	Solución BSA 2.0 mg/mL (μL)	Solución buffer fosfato 0.1M pH 6 (μL)	Volumen final (μL)	Concentración de BSA (mg/mL)
1	100	400	500	0.4
2	150	350	500	0.6
3	200	300	500	0.8
4	250	250	500	1.0
5	300	200	500	1.2

Tabla 11*Curva de calibración del método de Bradford.*

Patrón	Solución BSA (μL)	Solución buffer fosfato 0.1 M pH 6 (μl)	Reactivo Bradford (mL)	Concentración de BSA (μg/mL)
Blanco	-	100	3	-
1	100 (Muestra 1)	-	3	12.9
2	100 (Muestra 2)	-	3	19.3
3	100 (Muestra 3)	-	3	25.8
4	100 (Muestra 4)	-	3	32.3
5	100 (Muestra 5)	-	3	38.7

4.4. Determinación de la actividad enzimática de α -amilasa

4.4.1. Efecto de la concentración de enzima

Para el estudio de la actividad enzimática según la concentración de α -amilasa presente en la reacción, se realizaron variaciones del volumen de extracto enzimático adicionado en la muestra (Tabla 12).

Tabla 12

Variación de la concentración de α -amilasa en la reacción.

Muestra	Solución de almidón		Reactivo de Lugol (μ L)	Buffer fosfato 0.1 M (μ L)	Extracto enzimático (μ L)	HCl 0.1 M (μ L)	Volumen total (mL)
	%p/v	mL					
1	0.1	1	10	700	300	990	3
2	0.1	1	10	400	600	990	3
3	0.1	1	10	100	900	990	3
4	0.5	0.8	10	-	1200	990	3
5	0.4	0.5	10	-	1500	990	3

Teniendo en cuenta que la concentración inicial de la solución de almidón debía garantizarse constante para todos los experimentos, se emplearon soluciones de almidón al 0,1, 0,25 y 0,4 %p/v; así, para un volumen total, en el que se iba a desarrollar la reacción, correspondiente a 2,010 mL, los primeros 3 experimentos se prepararon con 1 mL de solución de almidón al 0,1 %p/v y se completó el volumen total con buffer fosfato 0,1 M pH 6; para el cuarto y quinto experimento, se adicionó 800 μ L de una solución de almidón al 0,25 %p/v y 500 μ L de una solución de almidón al 0,4 %p/v, respectivamente. Por consiguiente, a cada muestra, se adicionó 10 μ L del reactivo de Lugol y se calentó a 50 °C (Aljabi, 2014) durante 15 minutos ; transcurrido el tiempo de calentamiento, se adicionaron los diferentes volúmenes de extracto

enzimático y se detuvo la reacción con 990 μ L de HCl 0.1M ocasionando un cambio brusco en el pH de la solución que asegurara la inactivación de la enzima α -amilasa como consecuencia de su desnaturalización, se tomó registro del tiempo transcurrido de reacción, cuando visualmente la solución tornara a un color azul violeta que permitiera medirse en el espectrofotómetro y se obtuviera así valor de absorbancia dentro de una escala de 0 a 1, asegurando siempre que aún existiera una cantidad de almidón presente en la muestra y detectada por el reactivo de Lugol. Por último, se dejó en reposo la muestra hasta que se encontrara a temperatura ambiente, enseguida se midió su absorbancia a 570 nm; en cada caso, se realizó la corrección de línea base con un blanco que fue sometido a la misma preparación de las muestras, pero reemplazando el volumen de solución de almidón por un volumen igual de agua tipo I. Cada muestra se preparó por triplicado y se determinó la actividad enzimática con el promedio de las absorbancias.

4.4.2. Efecto del pH

Inicialmente, se preparó una solución de HCl al 0.1 M y una solución de NaOH al 0,1 M; con las mismas, se determinó la cantidad a adicionar con el fin de variar el pH de la muestra en un rango de 3 a 9. Teniendo presente el mismo principio de mantener la concentración inicial de almidón constante para todos los experimentos, se calculó y preparó las soluciones de almidón a las concentraciones adecuadas para que, al realizar la adición de los volúmenes de ácido o base previamente calculadas, la concentración de la solución de almidón final permaneciera en 0,1 %p/v (Tabla 13).

Por consiguiente, se empleó 1 mL de solución de almidón al 0,1% p/v asociada a cada pH y 10 μ L de reactivo de Lugol para cada muestra; se mantuvo en calentamiento a 50 °C durante 15 minutos y se adicionó 1 mL de extracto enzimático que contiene α -amilasa; una vez transcurrido un tiempo determinado y registrado, se detuvo la reacción con 990 μ L de HCl 0.1 M, enseguida

se enfrió la muestra hasta temperatura ambiente; por último, se realizó la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm, haciendo efectiva la corrección de la línea base usando un blanco preparado bajo las mismas condiciones que la muestra, pero reemplazando el volumen correspondiente a la solución de almidón con 1 mL de agua tipo I. Cada muestra se realizó por triplicado y se obtuvo la actividad enzimática con el promedio de las absorbancias.

Tabla 13

Soluciones de almidón 0.1% p/v a diferente pH.

pH	Solución HCl 0.1 M (μ L)	Solución NaOH 0.1 M (μ L)	Solución almidón %p/v	Solución (μ L)	Volumen final (mL)	Concentración final de almidón (%p/v)
3	230	-	0.2597	770	1	0.1
4	125	-	0.2286	875	1	0.1
5	105	-	0.2235	895	1	0.1
7	-	440	0.3571	560	1	0.1
8	-	830	1.1765	170	1	0.1
9	-	915	2.3529	85	1	0.1

4.4.3. Efecto de la temperatura

Con el fin de determinar la temperatura óptima de la enzima α -amilasa se realizó la variación de temperatura en un rango de 20 a 100 °C, haciendo mediciones cada 10 °C; por lo tanto, en un tubo de centrífuga cónico falcon de 15 mL, se añadieron 1 mL de solución de almidón al 0,1 %p/v y 10 μ L del reactivo de Lugol; se dispuso la muestra en un baño maría a las diferentes temperaturas de evaluación, transcurridos 15 minutos de calentamiento se dio comienzo a la reacción adicionando 1 mL de extracto crudo que contenía a α -amilasa pH 6; se permitió que la enzima desarrollara su papel en la reacción y cuando visualmente la solución tomó un color

medible en el espectrofotómetro para el cual se obtuviera un valor de absorbancia dentro de una escala de 0 a 1, se detuvo la reacción con 990 μ L de HCl 0.1 M y se registró el tiempo. Finalmente, cuando la muestra se encontró a temperatura ambiente, se realizó la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm, corrigiendo la línea base con un blanco sometido al mismo procedimiento de elaboración de las muestras, pero esta vez reemplazando el volumen de solución de almidón por un mismo volumen de agua tipo I. Cada muestra se realizó por triplicado y se determinó la actividad enzimática con el promedio de las absorbancias.

4.4.4. Cinética enzimática

Con la finalidad de determinar las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de α -amilasa, se realizaron cinco curvas de progreso utilizando soluciones de almidón al 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 y 0,6 % p/v. En cada caso, las muestras se prepararon como se consigna en la Tabla 14, incubando las mismas en un baño maría a 80 °C durante 15 minutos, esto de forma previa a agregar el volumen correspondiente (1 mL) de extracto enzimático que contenía a α -amilasa pH 6; enseguida, se evaluó y se registró la acción de la enzima α -amilasa para cada concentración de solución de almidón a tres tiempos diferentes expresados en minutos, para cada uno de los casos se detuvo la reacción con la solución de HCl 0.1 M (990 μ l), se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm utilizando el blanco para la corrección de línea base con un tratamiento similar a las muestras pero reemplazando el volumen de solución de almidón por 1 mL de agua tipo I.

Para cada uno de los tres tiempos determinados por concentración de solución de almidón, se realizó la medición por triplicado; con el promedio de las absorbancias y los tiempos registrados se procedió a graficar cada una de las curvas de progreso para cada concentración de solución de almidón empleada. Seguidamente y de acuerdo a la teoría se asoció a cada curva de progreso una

línea recta tangente a la curva con inicio en tiempo cero, esto con el fin de determinar la velocidad inicial de reacción para cada una de las concentraciones de almidón mediante la determinación de la pendiente asociada a dicha recta, con esta información se realizó el diagrama de doble recíproco también conocida como la gráfica de Lineweaver-Burk, este mismo es quien nos proporciona, en el intercepto con el *eje x*, la constante de Michaelis-Menten despejada de $-1/K_m$ además del intercepto con el *eje y* quien brinda información acerca del valor de la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) que bien se puede despejar de $1/V_{m\acute{a}x}$.

Tabla 14

Preparación de muestras para la elaboración de curvas de progreso.

Muestra	Solución de almidón		Agua tipo 1 (mL)	Reactivo lugol (μ L)	Extracto enzimático α -amilasa (mL)	Solución HCl 0.1 M (μ L)	Volumen total (mL)
	(%p/v)	mL					
Blanco	-	-	1	10	1	990	3
1	0.2	1	-	10	1	990	3
2	0.3	1	-	10	1	990	3
3	0.4	1	-	10	1	990	3
4	0.5	1	-	10	1	990	3
5	0.6	1	-	10	1	990	3

4.4.5. Determinación de la actividad enzimática por método DNS y método de Lugol

Con el objeto de comparar ambos métodos espectrofotométricos (método DNS y método de Lugol) se llevó a cabo la determinación de la actividad enzimática para α -amilasa con cada uno de ellos; Para el método de Lugol, las muestra se realizaron adicionando 1 mL de solución de almidón al 0,1 %p/v y 10 μ L del reactivo de Lugol; dicha muestra se incubó en un baño maría a 80 °C durante 15 minutos, luego se dio inicio a la reacción adicionando 1 mL de extracto crudo que contiene α -amilasa pH 6 y al cabo de 15 segundos, se detuvo la reacción con 990 μ L de HCl

0.1 M . La muestra se realizó por triplicado y se midió la absorbancia a 570 nm, haciendo la corrección de línea base utilizando como blanco una muestra que contenía 1 mL de agua tipo I en reemplazo al volumen correspondiente a la solución de almidón. La medición se realizó por triplicado y la actividad enzimática se determinó con el promedio de las absorbancias.

En el caso del método DNS, se preparó el reactivo de DNS, y junto a él una solución estándar de glucosa 5 mM, a partir de ella se elaboraron los patrones como se consigna en la tabla 15 y con ellos se realizó la curva de calibración como se describe en la tabla 16.

Tabla 15

Patrones para la curva de calibración del método DNS.

Muestra	Solución glucosa 5mM (mL)	Agua tipo I (mL)	Volumen final (mL)	Concentración de glucosa (mM)
1	0.6	4.4	5	0.6
2	0.8	4.2	5	0.8
3	1.0	4.0	5	1.0
4	1.2	3.8	5	1.2
5	1.4	3.6	5	1.4

Cada uno de los patrones pertenecientes a la curva se realizaron por triplicado, todos ellos, incluyendo el blanco se calentaron en un baño maría de agua en ebullición constante durante 15 minutos, posteriormente se enfriaron en un baño de hielo y se realizó la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

Tabla 16*Curva de calibración para el método DNS.*

Patrón	Solución glucosa (mL)	Agua tipo I (mL)	Reactivo DNS (mL)	Concentración de glucosa (mM)
Blanco	-	1.5	1.5	-
1	1.5 (Muestra 1)	-	1.5	0.3
2	1.5 (Muestra 2)	-	1.5	0.4
3	1.5 (Muestra 3)	-	1.5	0.5
4	1.5 (Muestra 4)	-	1.5	0.6
5	1.5 (Muestra 5)	-		0.7

Por consiguiente, para la determinación de la actividad enzimática de α -amilasa, se procuró garantizar un tratamiento muy similar al recibido por los complejos yodo-almidón dispuestos en el método de Lugol; esto con el fin de llevar a cabo de la forma más conveniente la comparación, para ello se dispuso en un tubo de centrifuga cónico falcon de 15 mL, 1 mL de solución de almidón al 0,1 % p/v y 10 μ L de solución buffer fosfato 0,1 M pH 6; se calentó a 80 °C durante 15 minutos y se dio inicio a la reacción adicionando 1 mL de extracto crudo que contiene α -amilasa pH 6; posteriormente, se detuvo la reacción al cabo de 15 segundos con 990 μ L de HCl 0.1 M, se enfrió hasta temperatura ambiente y enseguida se realizó una dilución 1:10 de dicha muestra, esto a fin de obtener absorbancias menores a la unidad ya que se presentó una fuerte coloración; finalmente, se adicionó 1,5 mL del reactivo de DNS a 1,5 mL de la muestra diluida, se calentó en un baño maría de agua en ebullición constante durante 15 minutos, a continuación, se enfrió en un baño de hielo y se realizó la medición de absorbancia a 540 nm. La muestra se realizó por triplicado y se determinó la actividad enzimática con el promedio de las absorbancias.

Para determinar la concentración de azúcares reductores iniciales en el extracto enzimático que contiene a α -amilasa se preparó una dilución 1:10 del mismo, a esta dilución se le realizó un tratamiento idéntico al que describe anteriormente y la medición de absorbancia a las mismas condiciones. Cada muestra fue realizada por triplicado y se utilizó el promedio de las absorbancias para la determinación de la actividad enzimática.

5. Resultados y análisis

5.1. Estandarización del Método de Lugol

Una vez concluidos los ensayos preliminares y con el objetivo de orientar la investigación del reactivo de Lugol y sus diferentes variables encontradas, se estableció; 1) La concentración de la solución de almidón a emplear en todo el estudio, 2) la relación entre el reactivo de Lugol y la solución de almidón para preparar el complejo yodo-almidón, y 3) la preparación de una solución $I_2:KI$ con un comportamiento lineal, con el fin de ser definida como el reactivo de Lugol a emplear en la aplicación del método de Lugol para la determinación de la actividad enzimática de α -amilasa extraída de *Zea Mays L.*

5.1.1. Ensayos preliminares

Para estudiar el reactivo de Lugol y sus variables, primero se estableció la concentración de almidón con la cual, en todo el desarrollo de la investigación, se obtuviera una señal medible del complejo yodo-almidón garantizando que no fuera necesaria la dilución del mismo; debido a que, al aplicar diluciones, se observaron variaciones en los resultados obtenidos y a su vez, aumentaron los errores experimentales. Por otro lado, se determinó la relación entre el almidón y

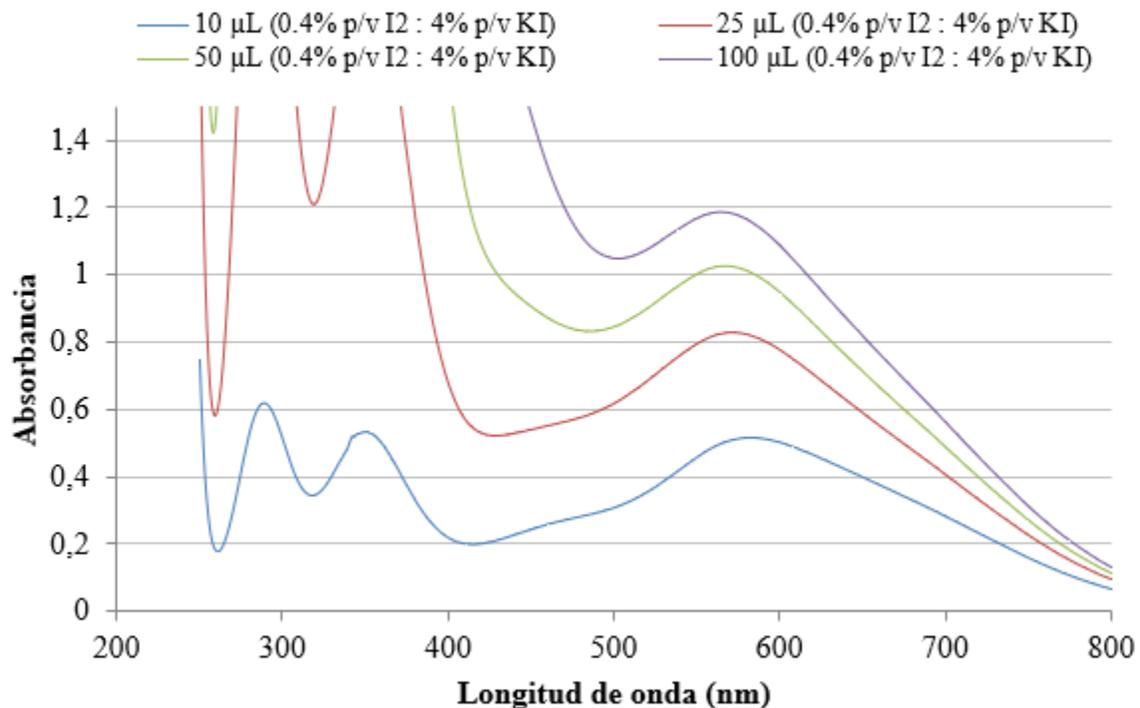
la solución $I_2:KI$ para la cual, no se presentará interferencia o solapamiento entre la banda del complejo yodo-almidón y la de la solución $I_2:KI$, debido a un exceso de $I_2:KI$.

En los resultados obtenidos para la determinación de la relación de la solución $I_2:KI$ y solución de almidón en el complejo (Figura 15), se observó solapamiento entre la banda del complejo yodo-almidón, con máximo de absorción en 580 nm, y la banda de la solución $I_2:KI$ (a menor longitud de onda) al adicionar 100 μL , debido a que esta, se vuelve más ancha a medida que el complejo $I_2:KI$ aún disponible después de la formación del complejo yodo-almidón, aumenta. Por otra parte, al adicionar 50 μL , la absorbancia del complejo yodo-almidón supera la unidad y con 25 μL , la absorbancia se acerca a uno.

El ensayo con 10 μL de solución $I_2:KI$ presentó una resolución de las bandas definida y la absorbancia en el máximo de absorción en 580 nm se encuentra alrededor de 0,5, por lo cual fue este el volumen de solución $I_2:KI$ apropiado para realizar el estudio del reactivo de Lugol debido a que se utilizaron diferentes volúmenes de la solución $I_2:KI$ y así se garantizó que en la gran mayoría de experimentos la absorción del complejo yodo-almidón presentara una absorbancia menor a uno.

Figura 15

Estudio de la variación del volumen de $I_2:KI$ sobre la absorbancia del complejo yodo-almidón.



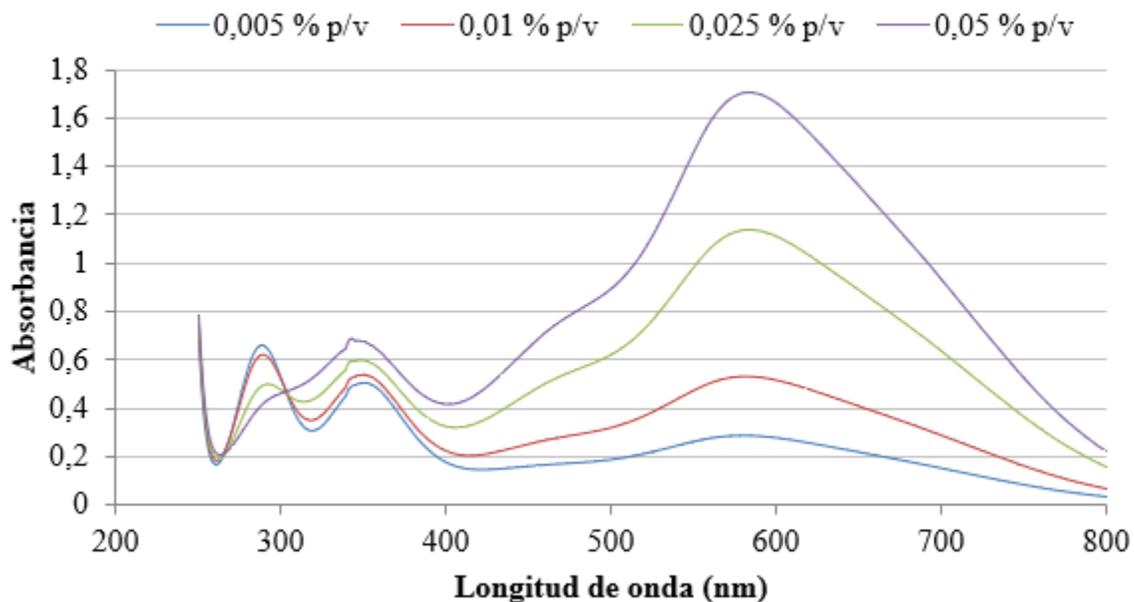
Nota. El volumen correspondiente a 10 μL de solución $I_2:KI$ fue la cantidad seleccionada y utilizada en los posteriores estudios.

Adicionalmente, en la variación de la concentración de las soluciones de almidón, el complejo yodo-almidón presentó su máximo de absorción a 580 nm (Figura 16), el cual se evidenció, con una banda de absorción resuelta y sin solapamiento con las bandas de absorción correspondiente a las de la solución $I_2:KI$ empleada, presentes entre 280-400 nm. Se obtuvo una absorbancia menor a la unidad usando las concentraciones de solución de almidón de 0,005 % p/v y 0,01 % p/v; sin embargo, se observó una banda con mayor resolución utilizando la solución de

almidón al 0,01 % p/v; por lo tanto, dicha solución fue seleccionada para el posterior estudio del reactivo de Lugol.

Figura 16

Estudio de la concentración de almidón (% p/v) sobre la absorbancia del complejo yodo-almidón.



Nota. La solución de almidón al 0,01% p/v fue seleccionada y empleada para los posteriores estudios.

5.1.2. Estudio del reactivo de Lugol

En primera instancia, como parte de los ensayos previos, se determinó una proporción mínima de 1:5 entre el yodo molecular y el yoduro de potasio en concentraciones % p/v, para garantizar la completa disolución del yodo en agua por la formación de poliyoduros (I_n^-) ($n=3,5,9\dots$) (Moulay, 2013). Por consiguiente, con el objetivo de definir la cantidad de yodo molecular y yoduro de potasio, máxima a agregar en el reactivo que a su vez permitiera asegurar valores de absorbancia en un rango de cero a uno, se llevó a cabo un ensayo en el que se prepararon tres soluciones de $I_2:KI$ a diferentes relaciones de concentración (1% p/v de I_2 y 5.15% p/v de KI ;

2.05% p/v de I_2 y 10.3% p/v de KI; 3.1% p/v de I_2 y 15% p/v de KI), siguiendo así la proporción de disolución (1:5) establecida inicialmente (Tabla 5).

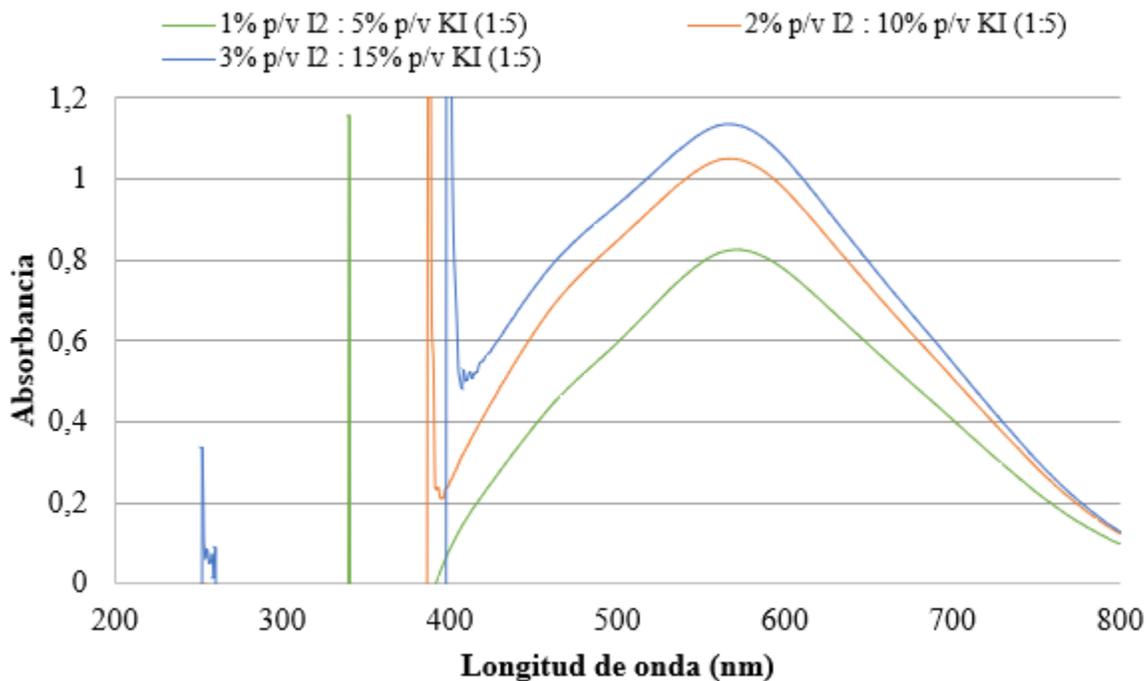
Al realizar la medición del espectro electromagnético en un rango de 200-800 nm, se evidenció el máximo de absorción del complejo yodo-almidón en una longitud de onda igual a 570 nm (Figura 17), a diferencia del máximo de absorción del complejo yodo-almidón a una longitud de onda de 580 nm observado previamente (Figura 15 y 16), esta diferencia se debe a que en los ensayos previos se realizó la corrección de la línea base con un blanco que contenía únicamente volumen de agua tipo I por lo que, se presentó un corrimiento en la banda relacionada al máximo de absorción del complejo yodo-almidón; razón por la cual en los ensayos posteriores se realizaron las mediciones de absorción a una longitud de onda de 570 nm. además, se observó que los complejos yodo-almidón formados con las soluciones I_2 :KI: 2.05% p/v de I_2 y 10.3% p/v de KI; 3.10% p/v de I_2 y 15% p/v de KI correspondieron a un valor de absorbancia mayor a la unidad, por lo tanto, se estableció una solución de I_2 :KI, 2.05% p/v de I_2 y 10.3% p/v de KI, como la relación máxima que permite desarrollar la evaluación.

Con los datos obtenidos anteriormente se llevó a cabo la prueba de homogeneidad de varianzas la cual presentó un valor de P mayor a 0,05, indicando que para dichos valores no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar con el 95 % de confianza; posteriormente se realizó la prueba de distribución normal para cada conjunto de datos, de ella se obtuvieron valores de P superiores a 0,05, por lo cual, no se puede rechazar la idea de que todos los datos provienen de una distribución normal con el 95% de confianza. Adicionalmente, se visualizó un cambio significativo en la absorción del complejo a medida que aumentó la concentración de los reactivos en la solución I_2 :KI. Se corroboró lo observado en la

gráfica, realizando un análisis estadístico de ANOVA simple para un factor teniendo como variable dependiente la absorbancia a 570 nm (ver Apéndice C).

Figura 17

Efecto de la concentración de $I_2:KI$ sobre la absorbancia del complejo yodo-almidón.



Nota. Se estableció $I_2:KI$, 2.05% p/v de I_2 y 10.3% p/v de KI como la concentración máxima a evaluar.

A continuación, teniendo en cuenta la información obtenida anteriormente, se estudió: a) la variación de la concentración de KI manteniendo la concentración de I_2 constante y b) la variación de la concentración de I_2 manteniendo la concentración de KI constante en la preparación de la solución $I_2:KI$, con el fin de evaluar cuál de los dos reactivos presentes en la solución $I_2:KI$ sería el determinante en la detección de almidón en la muestra.

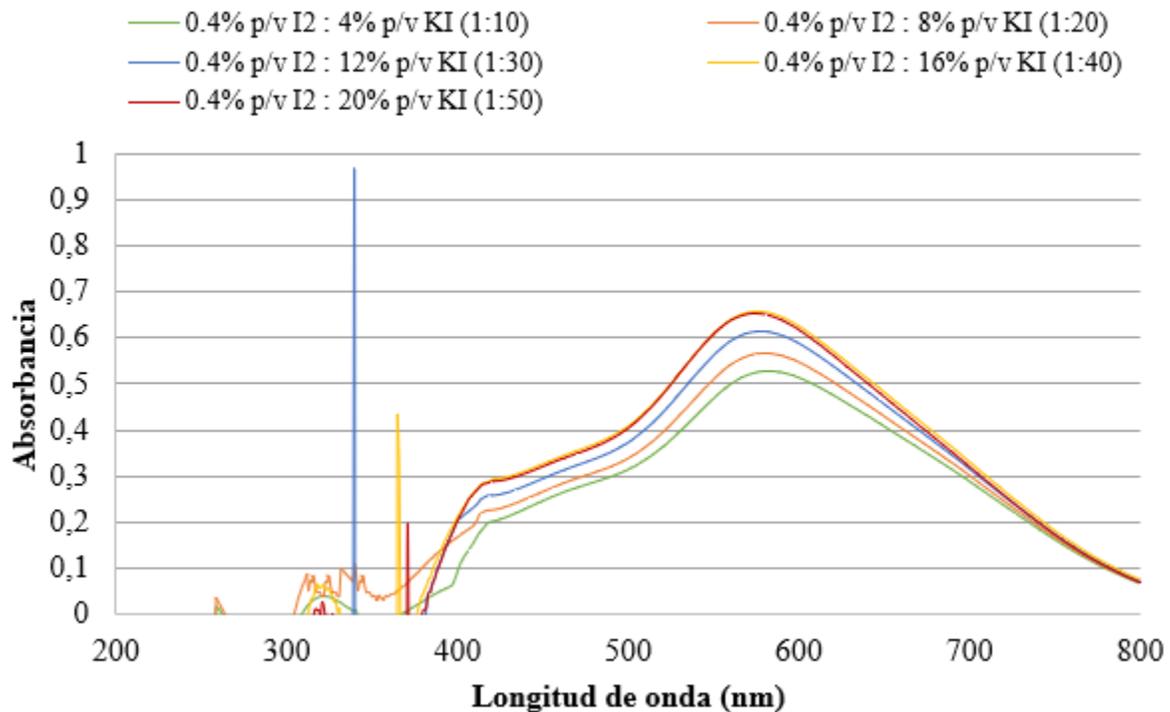
En primera instancia, al variar la concentración de KI manteniendo la concentración de I_2 constante en la solución $I_2:KI$ se apreció un cambio significativo en la concentración de yodo en

la solución (Tabla 6); por lo que, se especula que de la relación $I_2:KI$, es este último (yoduro de potasio) de quien depende la concentración de yodo en la solución $I_2:KI$. Por otra parte, al graficar el espectro electromagnético de los complejos yodo-almidón formados con las diferentes soluciones $I_2:KI$, se observó un cambio entre las absorbancias menor a 0,1 de forma creciente a medida que aumentó la concentración de KI en la muestra (Figura 18), esto se debe a que al aumentar la cantidad de iones yoduro en la solución $I_2:KI$, aumenta la formación de cadenas de poliyoduro de menor tamaño (I_3^- , I_5^-), las cuales en la formación del complejo yodo-almidón, se estiman como las subestructuras clave, ya que quedan atrapadas con mayor facilidad en las hélices de amilosa (Yu, et al., 1996); a su vez, llegado el límite de saturación en el cual se presenta un exceso de iones yoduro, no habrá un cambio significativo en la absorción del complejo yodo-almidón debido a que la relación entre los iones de yoduro y las moléculas de yodo sería igual a uno (Yu, et al., 1996), por lo cual, la concentración del poliyoduro I_3^- permanecerá constante; como consecuencia, la absorción del complejo permanecerá constante, como se observa en la absorción de los complejos 4 y 5.

Por medio de un análisis estadístico ANOVA simple para un factor teniendo como variable dependiente la absorbancia a 570 nm, se obtuvo un valor de F mayor que el F umbral del 95% e igual a 3,48, lo cual indicó una diferencia significativa entre los experimentos realizados; sin embargo, según la gráfica de medias y 95% de Fisher se demostró que los complejos yodo-almidón a los cuales llamaremos 4 y 5 para mayor facilidad, no presentaron un cambio significativo en la señal (ver Apéndice D).

Figura 18

Efecto de la variación de KI (en I₂:KI) sobre la absorbancia del complejo yodo-almidón.



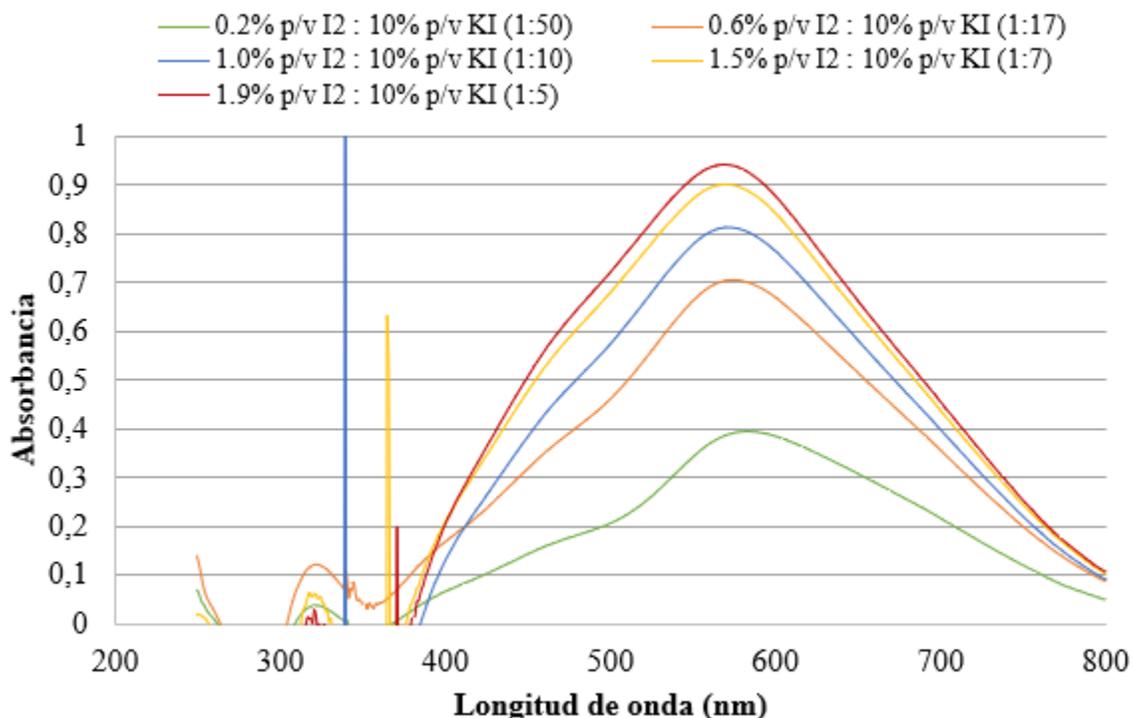
Nota. El cambio de absorbancia entre cada muestra y su consecutiva fue menor a 0,1.

En segunda instancia, al modificar la concentración de I₂ adicionado en el momento de preparar la solución I₂:KI, no se observó un cambio significativo en la concentración de final de yodo en la solución (Tabla 7); por lo tanto, se especula que la concentración de yodo en la solución de I₂:KI no depende significativamente de la cantidad de I₂ adicionado en él; Sin embargo, se visualizó un cambio considerable en la absorción del complejo yodo-almidón a medida que aumentó la concentración de I₂ en la solución I₂:KI (Figura 19); a su vez, se evidenció que la absorbancia a 570 nm, de los complejos yodo-almidón que llamaremos 4 y 5 para mayor facilidad, presentaron una diferencia menor a 0,1. El comportamiento observado, se asocia a la cantidad de moléculas de yodo disponibles para la formación de cadenas de poliyoduro, ya que al aumentar el

yodo molecular en la solución $I_2:KI$, aumenta la presencia de poliyoduros (I_3^- , I_5^-) en la solución y por lo tanto, es mayor la absorción de los mismos en las hélices de la amilosa lo cual es evidenciado en el aumento de la absorción del complejo yodo-almidón; por otra parte, la variación menor a 0,1 obtenida para el complejo 4 y 5, se debe a que la proporción entre $I_2:KI$ es 1:7 y 1:5 en % p/v, respectivamente, por lo tanto, aunque aumentó la cantidad de yodo molecular en la solución, la disponibilidad de los iones yoduro en este caso, favorece la formación de cadenas de poliyoduro de mayor tamaño (I_9^{3-} , I_{11}^{3-} , I_{15}^{3-}) (Moulay, 2013), y como consecuencia, es similar la cantidad de cadenas de poliyoduro de menor tamaño (I_3^- , I_5^-) en ambos casos.

Figura 19

Efecto de la variación de I_2 (en $I_2:KI$) sobre la absorbancia del complejo yodo-almidón.



Nota. Se observó un cambio significativo en la absorción del complejo a medida que aumentó la concentración de I_2 en la solución $I_2:KI$.

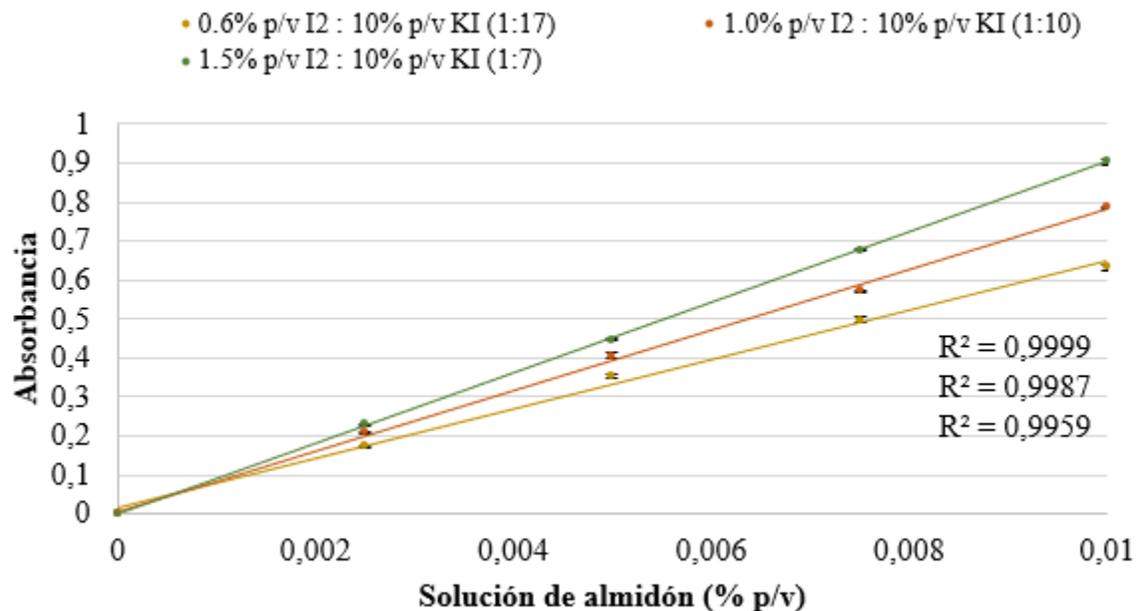
Complementario a lo observado en la gráfica, se realizó un análisis estadístico de ANOVA simple para un factor teniendo como variable dependiente la absorbancia a 570 nm. El valor de F obtenido es mayor que el F umbral del 95% igual a 3,48; por lo tanto, se verifica la diferencia significativa entre los experimentos realizados, disminuyendo la variación en la variable dependiente, en los complejos yodo-almidón 4 y 5, según la gráfica de medias y 95 % de Fisher. Con los datos obtenidos anteriormente, se llevó a cabo la prueba de homogeneidad de varianzas la cual presentó un valor de P mayor a 0,05, indicando que para dichos valores no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar con el 95 % de confianza; posteriormente se realizó la prueba de distribución normal para cada conjunto de datos, obteniendo valores de P superiores a 0,05, lo que significa que no se puede rechazar la idea de que todos los datos provienen de una distribución normal con el 95% de confianza (ver Apéndice E).

Finalmente, aunque la concentración de yodo en la solución $I_2:KI$ depende de la concentración de KI, se evidenció que la formación del complejo yodo-almidón depende de la concentración de I_2 en la solución de $I_2:KI$, ya que el valor de F umbral para la variación de I_2 fue, aproximadamente, 50 veces mayor que el obtenido para la variación de KI; debido a que, la absorción del complejo yodo-almidón depende de la cantidad de cadenas de poliyoduros de menor tamaño (I_3^- , I_5^-) presentes en la solución $I_2:KI$, las cuales aumentan de manera considerable al aumentar la cantidad de yodo molecular en la solución $I_2:KI$. Por lo tanto, se estudió la linealidad presentada por los complejos yodo-almidón obtenidos con tres de las soluciones $I_2:KI$ diferentes, preparadas variando la concentración de I_2 (Tabla 7, muestras llamadas 2, 3 y 4) y manteniendo la concentración de KI constante, dicho estudio se llevó a cabo mediante una curva de calibración

utilizando soluciones de almidón de diferentes concentraciones que varían entre 0.0025, 0.005, 0.0075 y 0.01 % p/v (Figura 20).

Figura 20

Curvas de calibración para las soluciones I₂:KI.



Nota. La solución 1.5% p/v I₂: 10% p/v KI presentó la mejor regresión lineal con un R²= 0,9999. Los valores obtenidos de absorbancia presentaron una desviación estándar menor a 0,01 (ver Apéndice F).

Gracias a los coeficientes de determinación (R²) obtenidos para cada curva de calibración, se logró evidenciar la linealidad de las mismas, ya que estos poseen valores cercanos a 1 y que a su vez aumentaron conforme aumentaba la concentración de I₂ en la solución de I₂:KI. Para la aplicación del método de Lugol en la determinación de la actividad enzimática y condiciones óptimas de α -amilasa, se empleó una curva de calibración, realizada utilizando como reactivo de Lugol, la solución preparada en una relación de 1,5% p/v de I₂ y 10 %p/v KI a las condiciones

descritas en la Tabla 8 y 9, dicha selección se dio debido a que el coeficiente de determinación obtenido para esa solución $I_2:KI$ fue el más cercano a 1 ($R^2=0,9999$) y por ende el mejor.

5.2. Extracción del extracto enzimático de semillas de *Zea Mays L.*

Inicialmente, las semillas adquiridas tenían un peso promedio de 1,835 g; después de la etapa de imbibición, en la cual, se presenta la absorción de agua a través de la cubierta de las semillas (Intagri S.C., 2016), el peso de las mismas, en promedio, fue de 2,248 g, teniendo así, una humedad promedio del 22,41%; a continuación, se dio inicio a la etapa de germinación con la reanudación de la actividad enzimática promoviendo una aceleración en la división y elongación celular, hasta que finalmente emergió el embrión a través de la cubierta de la semilla de maíz (Intagri S.C., 2016).

Al cuarto día de germinación se llevó a cabo el proceso de extracción, ya que se ha demostrado que la actividad enzimática de α -amilasa aumenta hasta el cuarto día de germinación y luego, se presenta una disminución de la actividad debido a la producción de inhibidores (por ejemplo, productos de hidrólisis) o por la disminución de la concentración de almidón en la semilla (Biazus, et al., 2009); por lo tanto, el cuarto día correspondería a la condición óptima de extracción. Al momento de separar las plántulas de maíz del algodón que se encontraba en el montaje, se observó que la mayoría de ellas presentaban radícula y coleóptilo, algunas tenían raíces seminales laterales, mesocotilo y variaba su tamaño; sin embargo, hubo semillas en las que el embrión apenas estaba emergiendo evidenciando un retraso en el proceso de germinación (Figura 21); por lo tanto, se separaron las semillas, aún sin germinar, de las plántulas de maíz, y estas últimas se utilizaron para la obtención del extracto enzimático.

Figura 21

Semillas de maíz al cuarto día de germinación.



Nota. El porcentaje de emergencia de radícula fue de 64.86%. En la mayoría de semillas se observó la presencia de la radícula y el hipocótilo.

Haciendo uso del filtro de membrana PVDF se logró separar moléculas de alto peso molecular y diámetro mayor a 13 μ m, incluyendo las moléculas de almidón aún presentes en el sobrenadante (Solís, et al., 2017); así, se obtuvo y se garantizó un extracto enzimático libre de almidón, que contenía además proteínas (incluida la enzima α -amilasa), azúcares reductores, iones Ca^{2+} , K^{+} , entre otras biomoléculas.

Con la finalidad de tener un extracto enzimático en el cual, la concentración de α -amilasa se mantuviera constante para el estudio de la actividad enzimática, condiciones óptimas y la cinética enzimática, se realizó el montaje de germinación para 185 semillas, de las cuales,

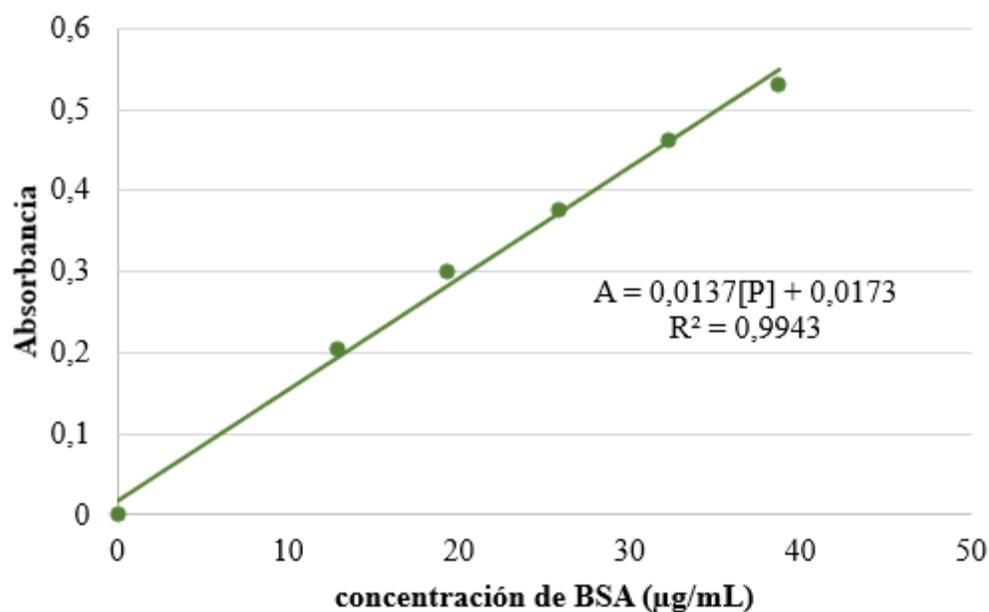
germinaron 120, obteniendo % total de emergencia (García López, et al. 2016) correspondiente a 64,86%. Para dicha cantidad de semillas germinadas, de acuerdo con su peso total (62,98 g), se agregó un volumen total de 524,34 mL de buffer fosfato 0,1 M pH 6, con los cuales se obtuvo un volumen final de extracto enzimático de 422.5 mL, después de las pérdidas presentadas en cada paso de la extracción.

5.3. Método de Bradford

Para la cuantificación de las proteínas totales se realizó la curva de calibración para el método de Bradford obteniendo un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9943$ (Figura 22); las mediciones realizadas para la construcción de la curva de calibración y para el extracto enzimático presentaron una desviación estándar menor a 0,022 y 0,003324, respectivamente, indicando que los valores tienden a estar agrupados cerca de su media (ver Apéndice G).

Figura 22

Curva de calibración del método de Bradford con albúmina sérica bovina.



Por medio de la ecuación lineal, asociada a la curva de calibración, se determinó la concentración total de proteínas en el extracto enzimático, utilizando el valor promedio de las absorbancias obtenidas para las tres réplicas. La concentración total de proteínas obtenida fue de 12,51 $\mu\text{g/mL}$; por lo tanto, la cantidad total de proteínas en la muestra fue de 5,28 mg.

Según la literatura, en el endospermo de las semillas de maíz, hay una composición porcentual, aproximadamente, del 10% de proteínas, 5% lípidos y 80% carbohidratos. Entre el 10% de proteínas se encuentran las proteínas de almacenamiento (4% albúminas, 2% globulinas y 85% prolaminas) cuya función principal es almacenar C, N y S para apoyar el crecimiento temprano de la plántula (Bewley, et al., 2013). En el momento en el que se activa el proceso de germinación, comienza la biosíntesis de enzimas hidrolíticas, la α -amilasa, con la cual la semilla obtiene la energía necesaria para su crecimiento por medio de la hidrólisis del almidón; por lo tanto, se puede asegurar que en la concentración de proteínas obtenida para la muestra se encuentra la enzima α -amilasa.

En estudios en los que se ha purificado la α -amilasa de hongos (*Penicillium commune*), se determinó que la presencia de α -amilasa en el extracto crudo fue del 0,146% del contenido total de proteínas en mg (Espinel & López, 2009); a su vez, en un estudio previo de la caracterización de α -amilasa de *Zea Mays L.* en relación a la actividad de α -amilasa en una etapa madura del grano, se determinó una composición química de 0,16 (CUg^{-1}) de proteína (Aljabi, 2014). Por lo cual, al cuarto día de germinación se especula una cantidad de α -amilasa de 10,56 μg en la muestra (0,2 %) y a su vez, una concentración de 24,99 ng/mL . Sin embargo, se estudió la variación de la concentración de enzima presente en la muestra utilizando como referencia, la concentración total de proteínas en el extracto crudo que contiene α -amilasa.

5.4. Determinación de la actividad enzimática de α -amilasa de *Zea Mays L*

Por medio de la ecuación lineal asociada a la curva de calibración del método de Lugol, previamente estandarizado, se obtuvo la cantidad en miligramos de almidón presente en la muestra después de la acción de α -amilasa en un tiempo específico, esto gracias a que las cadenas de poliyoduro I_2^- e I_3^- se incluyen en las hélices de amilosa formando así el complejo yodo-almidón de color azul-violeta el cual depende del tamaño de la cadena de amilosa, y reduce su intensidad de color conforme disminuye el tamaño de la misma además lo hace de forma proporcional a la actividad enzimática de α -amilasa; con la información de la cantidad de miligramos de almidón resultantes y teniendo presente la cantidad de almidón inicial en la muestra previo a la hidrólisis, se determinó así la actividad enzimática específica de α -amilasa, la cual se expresó en $U\text{mg}^{-1}$, definiendo una unidad (U) como la desaparición en promedio, de 1 mg del complejo yodo-almidón por minuto (Gupta, et al., 2003) sobre los miligramos de proteína total (0,01251 mg) obtenidos previamente utilizando el método de Bradford, dato a considerar debido a que no se llevó a cabo la purificación de la enzima, por lo que se recomienda realizar dicho procedimiento con el fin de verificar los resultados obtenidos.

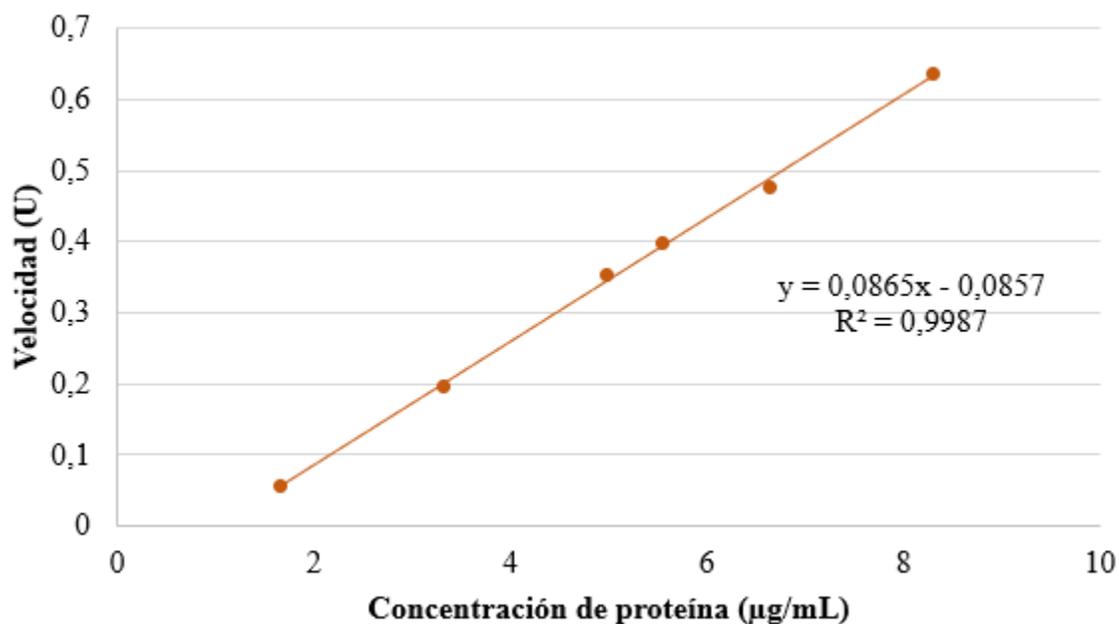
Adicionalmente, después de múltiples intentos, al adicionar cloruro de calcio al buffer fosfato 0,1 M pH 6, se observó un precipitado asociado a la formación de fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), una sal inorgánica, con interacciones covalentes entre los átomos de oxígeno de los fosfatos y los centros metálicos de calcio (Bolívar, 2019); por lo tanto, el extracto enzimático se utilizó sin adición de cloruro de calcio; sin embargo, se aseguró que la α -amilasa trabajara de forma eficiente, debido a que en el extracto había presencia de iones Ca^{2+} como consecuencia de su necesidad para la activación de la enzima α -amilasa en el grano de las semillas de maíz germinadas.

5.4.1. Efecto de la concentración de enzima

Como se mencionó anteriormente, se expresó la variación de la concentración de α -amilasa en la muestra asumiendo la concentración de α -amilasa como la concentración total de proteínas en el extracto enzimático que la contenía. Se observó que, al aumentar la concentración de enzima en la muestra, aumentó la velocidad de la reacción con un comportamiento lineal, obteniendo así un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9987$ (Figura 23).

Figura 23

Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática de α -amilasa de Zea Mays L.



Nota. Los valores obtenidos de absorbancia presentaron una desviación estándar menor a 0,15 (ver Apéndice H).

Como se puede apreciar en la figura, la línea recta que refleja el comportamiento de la variación de concentración de enzima con respecto a la velocidad de reacción no tiene origen en 0, sino que presenta un desplazamiento hacia valores mayores en el *eje x*, comenzando así en

0,9907 $\mu\text{g/mL}$, siendo este el intercepto en el *eje x* ($y=0$). Este corrimiento se explica y se relaciona al hecho de asumir y trabajar con la concentración total de proteínas presentes en la muestra de extracto enzimático, que contiene α -amilasa más otras proteínas, en lugar de tomar específica y únicamente aquella que corresponde a la enzima α -amilasa. Sin embargo teniendo en cuenta que la velocidad de reacción está relacionada directamente con la concentración de la enzima (Dixon & Webb, 2014), se determinó la diferencia entre la primera concentración utilizada (1,66 $\mu\text{g/mL}$) y el corrimiento presentado (0,9907 $\mu\text{g/mL}$); por consiguiente, se relacionó el valor obtenido (0,6708 $\mu\text{g/mL}$), con la concentración de proteínas total en el extracto enzimático (12,51 $\mu\text{g/mL}$), con lo cual, se estimó que la concentración de la enzima α -amilasa en el extracto fue de aproximadamente 5,05 $\mu\text{g/mL}$.

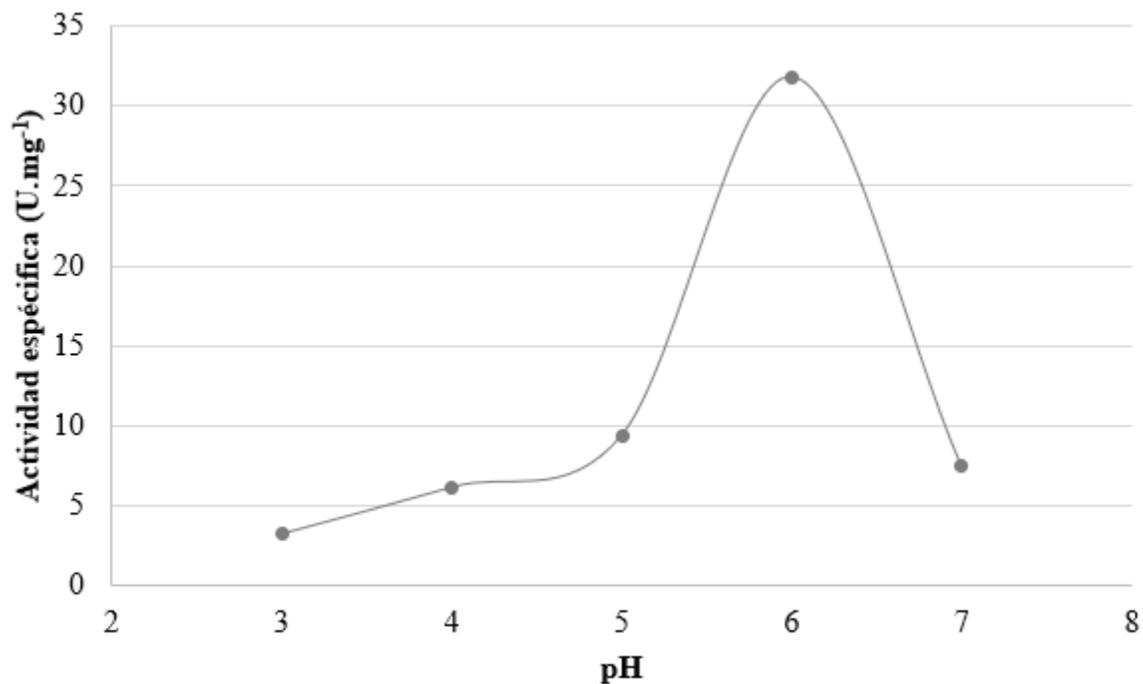
5.4.2. Efecto del pH

Tomando a consideración que la enzima α -amilasa es un polímero con múltiples formas iónicas (Yu, et al., 1996), debido a que en su estructura primaria tiene grupos radicales ionizables, es de esperarse que el pH en el que se desarrolle la reacción afecte la actividad enzimática de la misma, ya que las cargas sirven para estabilizar la conformación natural de la proteína o por el contrario, modificar su estructura causando la desnaturalización de la misma (Pérez & Noriega, s.f); es por ello que la mayoría de enzimas tienen un pH óptimo o característico en el cual demuestran un máximo en su actividad enzimática. Para el estudio de la variación de pH y su consecuencia en la actividad enzimática de α -amilasa, se realizaron mediciones a pH en un rango de 3 a 7, cada unidad (Figura 23). Se observó que la velocidad de reacción fue aumentando de forma leve conforme incrementó el pH, desarrollándose a velocidades bajas para pH 3 y 4; una vez se alcanzó el pH correspondiente a 5 se comenzó a evidenciar un aumento en la actividad enzimática de α -amilasa con un máximo a pH igual a 6, por lo que se asume éste como el pH

óptimo de la enzima α -amilasa extraída de *Zea Mays L.* Esta información además de confirmar los datos tomados de la literatura (Aljabi, 2014) (Biazus, et al., 2009), apoya y justifica el paso de extracción de la enzima α -amilasa que se llevó a cabo en una solución buffer fosfato 0,1 M pH 6 para desarrollar la investigación.

Figura 24

*Efecto del pH sobre la actividad enzimática de α -amilasa de *Zea Mays L.**



Nota. El pH óptimo fue 6. Los valores obtenidos de absorbancia presentaron una desviación estándar menor a 0,12 (ver Apéndice I).

Inicialmente en la investigación se planteó evaluar el efecto del pH en un rango entre 3 y 9; de acuerdo con ello, se prepararon las muestras conforme se describe en la metodología. Sin embargo cuando se llevó a cabo la formación del complejo yodo-almidón adicionando los 10 μ L de reactivo de Lugol al volumen correspondiente de las soluciones de almidón asociadas a los

valores de pH 8 y 9 no se evidenció la coloración azul-violeta característica de la formación del complejo, ni se observó la coloración rojiza oscura propia del reactivo de Lugol en ausencia de almidón; una vez se verificó que el reactivo de Lugol funcionara correctamente, se estudió la posibilidad de que, como estos valores de pH se alcanzaron agregando volúmenes mayores a 440 μL de solución de NaOH 0.1M, fuera esta misma la que estuviera interactuando con el reactivo Lugol. Se encontró que en soluciones alcalinas (pH mayor a 7), el yodo se ioniza formando yoduro (I^-) y yodato (IO_3^-) según la ecuación (3) (WebQC.Org, 2021) que aunque es reversible, en caso de que el medio contenga mayor concentración de iones OH^- en solución, el equilibrio de la reacción se desplazará hacia los productos haciendo propensa la disociación de los iones de yodo, lo que representa una afectación o modificación del reactivo de Lugol y por ende la aparición de un condicionamiento para el desarrollo del método de Lugol en la determinación cuantitativa de la actividad de α -amilasa.

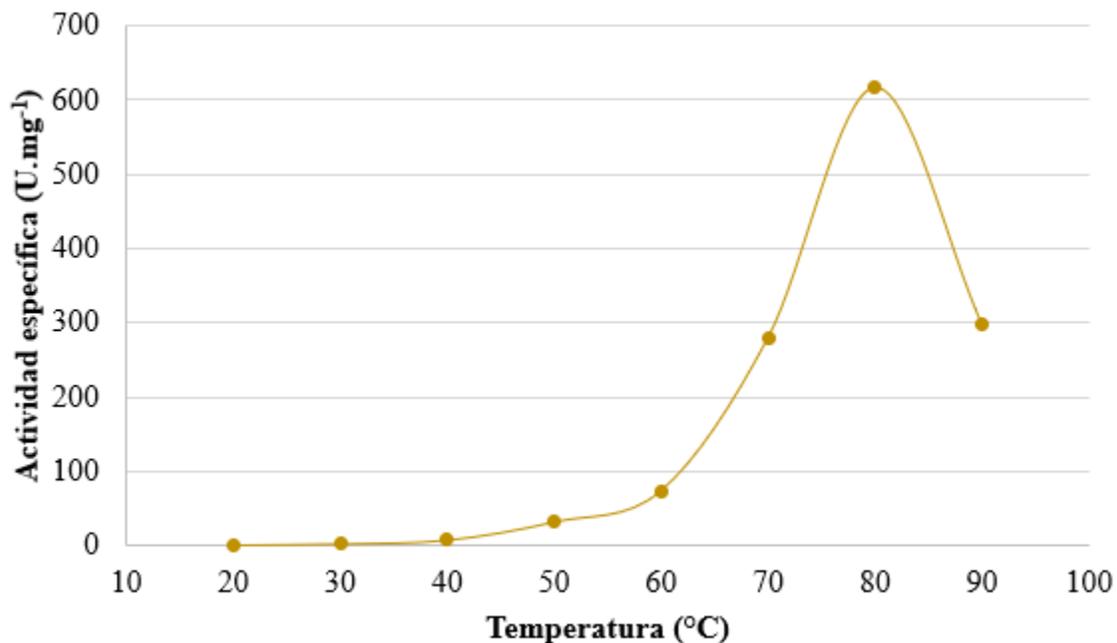


5.4.3. Efecto de la temperatura

Con el fin de determinar la temperatura óptima de α -amilasa, y, por lo tanto, su mayor actividad enzimática, se llevó a cabo la reacción enzimática variando la temperatura en un rango de 20 a 100 $^\circ\text{C}$, realizando mediciones cada 10 $^\circ\text{C}$ (Figura 25).

Figura 25

Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de α -amilasa de Zea Mays L.



Nota. La temperatura óptima fue a 80°C. Los valores obtenidos de absorbancia presentaron una desviación estándar menor a 0,15 (ver Apéndice J).

De forma general, un aumento de temperatura produce un aumento en la velocidad de cualquier reacción química (Pérez & Noriega, s.f). Para la reacción enzimática catalizada por la α -amilasa, inicialmente, se observó un aumento lento en la velocidad de la reacción, producto de la activación de la enzima; después de los 50°C, se observó un aumento considerable en la actividad enzimática, hasta llegar a los 80°C donde presentó el pico de actividad máximo; por lo cual, una vez pasados los 80°C disminuyó la velocidad de reacción gracias a la desnaturalización de la enzima y con ello la pérdida de su actividad enzimática.

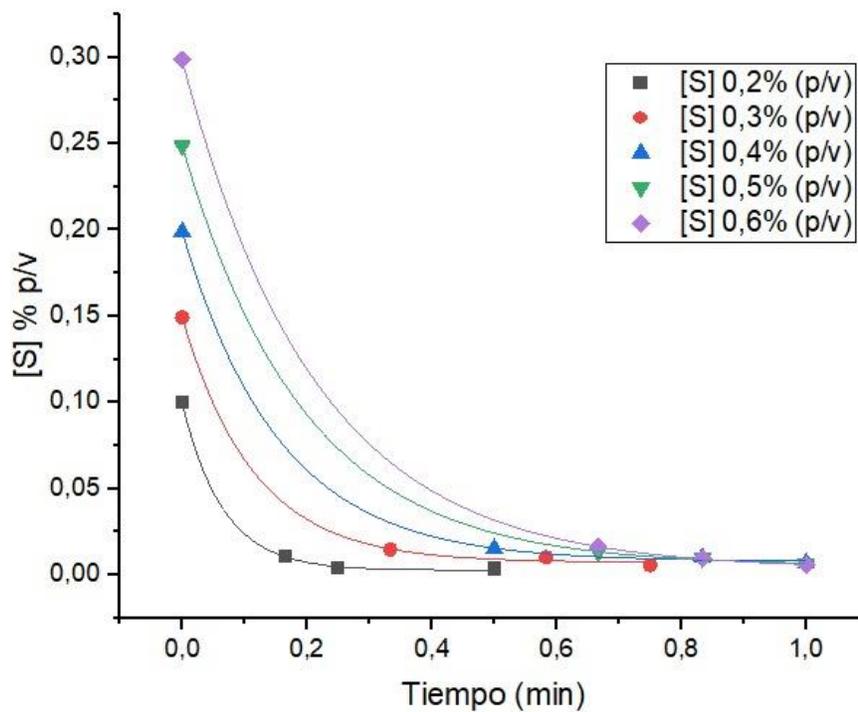
Por otra parte, al emplear el método de Lugol se presenta una limitación en la determinación de la actividad enzimática de α -amilasa, con respecto a la evaluación del mismo a temperaturas mayores a 90°C, esto debido a que se presenta una pérdida entre 2 y 4 % de los iones de yodo cuando se alcanza temperaturas cercanas a 100°C (Bhatnagar, et al., 1997); por lo tanto, no es posible detectar la cantidad de almidón presente en la muestra; lo cual se visualizó como una desaparición del color característico del complejo yodo-almidón en ausencia de la enzima α -amilasa una vez se alcanzó una temperatura de 100°C.

5.4.5. Cinética enzimática

La reacción enzimática catalizada por la α -amilasa se estudió por medio de la variación de la concentración de sustrato presente en la reacción y la observación de la desaparición del sustrato conforme se da la formación del producto; Para ello, se realizaron curvas de progreso para las cuales se fue determinando la concentración de almidón resultante en la muestra después de la acción de α -amilasa a un tiempo conocido, en las condiciones óptimas determinadas previamente (Figura 26). En las curvas de progreso se observó el estado estacionario, de menor duración, (parte decreciente con comportamiento lineal) y la fase de agotamiento (parte decreciente con comportamiento exponencial). El estado estacionario, es descrito por una reacción de orden cero, por lo que, en este momento la velocidad de reacción se encuentra dictada únicamente por la cantidad de enzima α -amilasa que permanece inalterada durante la reacción, independientemente de la concentración del sustrato; y la fase de agotamiento, descrita por una reacción de primer orden, en la cual la velocidad de la reacción se determina por la disminución del sustrato en función del tiempo (Bisswanger, 2017).

Figura 26

Efecto de la concentración de almidón (% p/v) sobre la cinética enzimática de α -amilasa de *Zea Mays L* a pH 6 y 80°C.

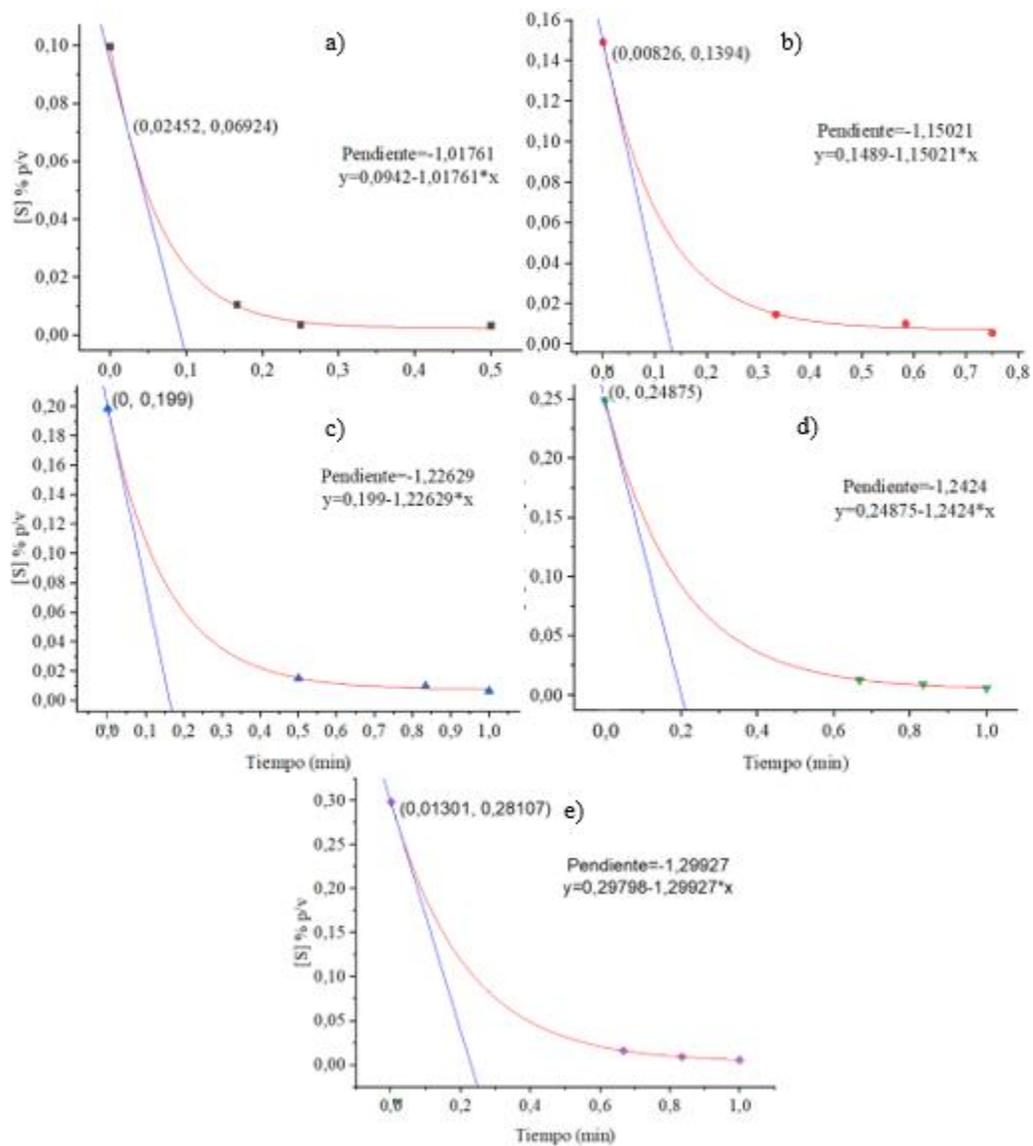


Nota. Los valores obtenidos de absorbancia presentaron una desviación estándar menor a 0,07 (ver Apéndice K).

Por medio de la pendiente de la línea tangente con inicio en tiempo cero ($t=0$), asociada a cada curva de progreso, se determinó la velocidad inicial (V_0) de cada reacción enzimática llevada a cabo a las diferentes concentraciones de sustrato inicial (Figura 27).

Figura 27

Determinación de la velocidad inicial de la reacción enzimática catalizada por α -amilasa de Zea Mays L.

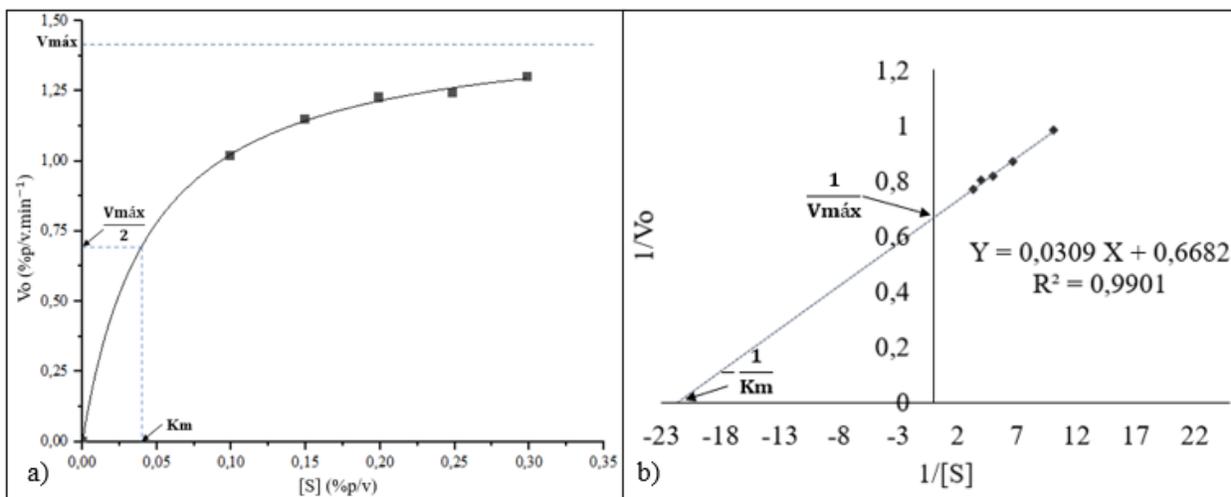


Nota. a), b), c), d) y e). Línea tangente a la curva de progreso obtenida con una concentración inicial de sustrato igual a 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 % p/v, respectivamente.

De una gráfica donde se exponga la concentración de sustrato con respecto a la velocidad inicial de la reacción catalizada por la α -amilasa (Figura 28.a), se puede obtener el valor de la $V_{m\acute{a}x}$ mediante una extrapolación, debido a que la velocidad inicial (V_o) asociada a altas concentraciones de sustrato, se acercará pero nunca alcanzará el valor de $V_{m\acute{a}x}$ y a su vez, el valor de K_m será la concentración de sustrato a la que V_o corresponda a la mitad del valor de la $V_{m\acute{a}x}$ (Lehninger, 2009); sin embargo, para evitar dichas aproximaciones y empleando un método de linealización que es aplicable a diseños experimentales, se llevó a cabo la transformación lineal de la ecuación de Michaelis-Menten, utilizando la forma recíproca de la misma, y se elaboró el diagrama de doble reciprocidad (diagrama de Lineweaver-Burk), con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9901$, obteniendo por medio del intercepto en *eje x* y *eje y* los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$, respectivamente (Figura 28.b).

Figura 28

Determinación de las constantes cinéticas de la reacción enzimática catalizada por α -amilasa de Zea Mays L.



Nota. a) Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial. b) Diagrama de Lineweaver-Burk para la reacción enzimática catalizada por la α -amilasa. El intercepto en *eje x* y *eje y* fue -21,62 y 0,6682, respectivamente.

Teniendo en cuenta que el intercepto con en el *eje x* (-21,62), corresponde a $-1/K_m$, despejando de la expresión, se obtuvo un valor de K_m igual a 0,04624 %p/v, equivalente en unidad de molaridad a $3,681 \times 10^{-5}$ M, esto indica una alta afinidad de la enzima α -amilasa por el sustrato. Esta afinidad alta se debe a la complementariedad estérica y a las múltiples interacciones entre los residuos aminoacídicos del sitio activo y el sustrato (Vera, 2007). A su vez, el intercepto con el *eje y* (0,6682), está ligado a la expresión $1/V_{m\acute{a}x}$, por lo tanto, a partir de ella se obtuvo un valor de $V_{m\acute{a}x}$ igual a 1,497 % p/v.min⁻¹, equivalente en unidad de molaridad por minuto a $1,191 \times 10^{-3}$ Mmin⁻¹, indicando que a dicha velocidad todas las moléculas de enzima disponibles participan en la reacción (Bisswanger, 2017).

En estudios previos en los que se ha caracterizado la enzima α -amilasa extraída de *Zea Mays L* se han empleado además métodos que determinan la actividad enzimática mediante la evaluación y medición de la desaparición del producto (azúcares reductores) y no, la desaparición de sustrato (almidón), se han obtenido valores de las constantes cinéticas para la reacción enzimática catalizada por la α -amilasa extraída de *Zea Mays L*. en granos tanto maduros como germinados (Tabla 17). En el caso de la constante K_m , con el método de Lugol se obtuvo un valor aproximadamente tres veces menor con respecto al obtenido por el método DNS (Aljabi, 2016) esta gran diferencia se atribuye a que la fuente de extracción corresponde a granos de maíz maduros, mientras que el valor determinado mediante el método DNS para los granos de maíz al cuarto día de germinación (Biazus et al., 2009) es mucho más cercano al reportado por el método estandarizado de Lugol, esta diferencia se puede asociar a que el método DNS no es específico para la caracterización de α -amilasa (Xiao, et al., 2006); aun así, todos los resultados representan una afinidad alta entre el sustrato y la enzima para la formación del complejo EA. Por otra parte, el valor de $V_{m\acute{a}x}$ depende de la concentración de enzima inicial al momento de llevarse a cabo la

reacción enzimática; por lo tanto, se observa una variación alta entre los resultados obtenidos en cada estudio.

Tabla 17

Comparación de constantes cinéticas de α -amilasa de *Zea Mays L.*

<i>Método empleado</i>	<i>Km (M)</i>	<i>V_{máx} (M.min⁻¹)</i>
Lugol	3.681x10 ⁻⁵	1.191x10 ⁻³
DNS (Biazus et al., 2009)	4.268x10 ⁻⁴	4.268
DNS (Aljabi, 2016) ^a	1.859x10 ⁻²	1.900x10 ⁻⁴
DNS (Aljabi, 2016) ^b	9.713x10 ⁻³	3.600x10 ⁻⁴

Nota. ^a constantes cinéticas promedio para cultivares de maíz en estado maduro en el 2010. ^b constantes cinéticas promedio para cultivares de maíz en estado maduro en el 2011.

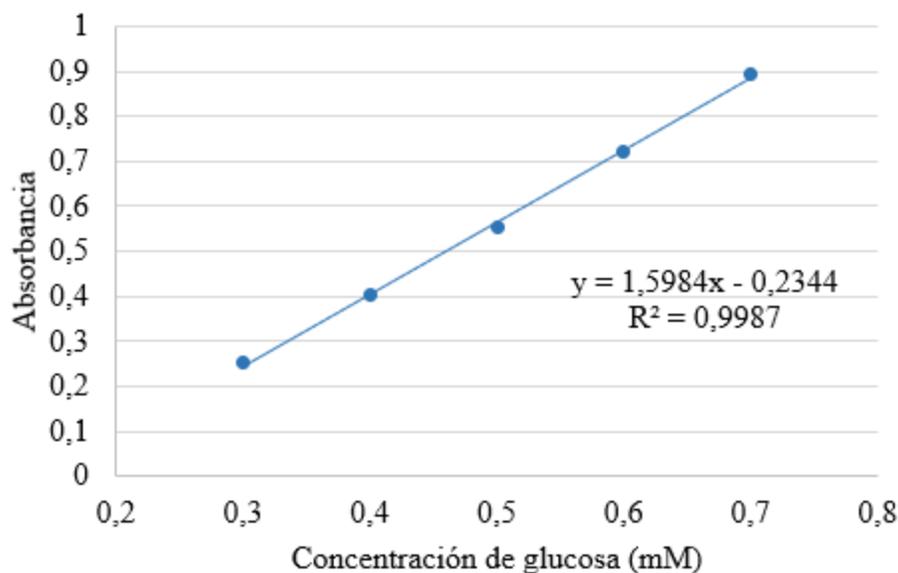
Una vez concluida la caracterización de α -amilasa y el estudio de su cinética enzimática, se plantea en forma de recomendación que, con el objetivo de complementar los resultados obtenidos, se realicen nuevamente mediciones de los parámetros cinéticos mediante la determinación de la absorbancia empleando un espectrofotómetro UV-VIS, procedimiento para el cual de forma previa se deben establecer las condiciones óptimas de la enzima, además de realizar el ajuste de línea base con un blanco que no contenga el analito; cada muestra se introduce en el equipo de forma inmediata tras la adición del extracto enzimático y se efectúan mediciones de absorbancia cada dos segundos durante un periodo de dos minutos, esto con la finalidad de obtener gran cantidad de resultados a lo largo de la reacción enzimática, para de esta manera realizar un ajuste que permita representar de forma más completa el comportamiento de la reacción enzimática aportando mayor cantidad de datos y reduciendo así el error en los cálculos posteriores.

5.4.6. Método DNS

Con el objetivo de comparar y validar el método de Lugol como un método específico y cuantitativo para la determinación de parámetros cinéticos y actividad enzimática de la enzima α -amilasa, se empleó el método DNS, este método es basado en la medición de la cantidad de azúcares reductores por acción del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959); además, es ampliamente conocido por su aplicabilidad para enzimas que catalizan reacciones hidrolíticas. Para su desarrollo se realizó una curva de calibración para la que se obtuvo un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9987$ (Figura 29); los valores adquiridos tanto para la construcción de la curva de calibración como los correspondientes a la muestra de extracto enzimático y los obtenidos para la actividad enzimática, presentaron una desviación estándar menor a 0.021, 0.004 y 0.0071 respectivamente; indicando que los valores tienden a estar agrupados cerca de su media (Ver apéndice L).

Figura 29

Curva de calibración del método DNS con solución de glucosa.



Mediante la ecuación lineal relacionada a la curva de calibración del método DNS se obtuvo la concentración final de azúcares reductores en la muestra (6,747 mM) detectados gracias a la reacción del ácido 3,5- dinitrosalicílico con el extremo carbonilo de los azúcares reductores resultantes tras la acción de α -amilasa en un tiempo conocido; se tomó el valor de absorbancia para calcular la concentración de azúcares reductores iniciales (5,589 mM) presentes en el extracto enzimático, con el fin de restarla a la concentración final de azúcares reductores una vez concluida la reacción ya que ambas están definidas para un mismo volumen de muestra; usando el resultado de dicha sustracción (1.158 mM) se determinó una actividad enzimática específica de 134,08 expresada en Umg^{-1} , donde una unidad (U) se definió como la aparición en promedio de 1 mg de azúcares reductores (glucosa) por minuto durante la reacción, valor que se dividió por la cantidad total de proteínas (0,01251 mg) presentes en el extracto enzimático que contiene α -amilasa.

De la comparación entre los datos obtenidos para cada método (Tabla 18), principalmente se concluyó que ambos métodos son reproducibles para la determinación de actividad enzimática de α -amilasa; sin embargo, se apreció que la cantidad de almidón consumida en miligramos por minuto (1.927 mg) determinada por el método de Lugol fue mayor a la cantidad de glucosa producida en miligramos por minuto (0.419 mg) medida usando el método DNS; en consecuencia, el valor correspondiente a la actividad enzimática específica de α -amilasa determinada por el método de Lugol fue aproximadamente, 4.6 veces mayor que el obtenido mediante el método DNS; de lo anterior se infiere que, como se conoce y se ha demostrado, el método DNS no es específico para la determinación de la actividad enzimática específica de α -amilasa (Xiao, et al., 2006) ya que con él se determinan azúcares reductores totales presentes en la muestra (Warner, et al., 1991); se conoce del mecanismo catalítico que tras la acción de α -amilasa se obtienen como producto azúcares reductores de diferentes tamaños, teniendo en cuenta que la curva de calibración

para el método DNS se realizó con un analito específico (glucosa), el valor de actividad enzimática reportado corresponde a un valor aproximado o relativo. Adicionalmente, la relación estequiométrica de la reacción química que ocurre entre el DNS y los extremos reductores corresponde a 1:3, por lo que la respuesta del reactivo a la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra es inferior, esto se ve reflejado en un valor de absorbancia más pequeño y, por lo tanto, una actividad enzimática específica menor para la enzima α -amilasa; esto nos permite inferir que el método DNS sólo ofrece una estimación cualitativa de los grupos reductores presentes en la muestra y no se recomienda para medir la actividad específica de α -amilasa o cualquier otra enzima que produzca una mezcla de azúcares reductores (Visvanathan, et al., 2020), mientras que el método estandarizado de Lugol es específico para la caracterización de α -amilasa ya que permite conocer la actividad enzimática de la misma conforme se da la desaparición de su único sustrato, el almidón.

Por otra parte, el método de Lugol presentó un comportamiento lineal y resultó ser un ensayo específico para la caracterización de α -amilasa, al hacer medible la desaparición del almidón, único sustrato de la enzima α -amilasa. Adicionalmente, el método de Lugol demostró ser un método altamente sensible ya que permite la detección de almidón y a diferencia del método DNS, no requiere altos volúmenes de reactivo, empleando únicamente 10 μ L de reactivo de Lugol; lo cual a su vez, representa una ventaja en comparación con el método de DNS, debido a que los residuos químicos generados con el reactivo de Lugol fueron más bajos para la misma cantidad de muestras y evaluaciones, resultando favorable para el medio ambiente, debido a que el reactivo de Lugol presenta una toxicidad acuática crónica de categoría 3 (Sigma-Aldrich, 2021).

Tabla 18

Actividad enzimática de α -amilasa de Zea Mays L a pH 6 y 80°C.

Método empleado	Actividad enzimática específica de α-amilasa	Unidades	U
Método DNS	134,07	Umg ⁻¹	Miligramos aparición de glucosa por minuto
Método lugol estandarizado	616,32	Umg ⁻¹	Miligramos desaparición de almidón por minuto

6. Conclusiones

Se estandarizó un método cuantitativo y espectrofotométrico sencillo, económico (bajos volúmenes de reactivo y muestra), sensible, reproducible y además mayormente específico para la enzima α -amilasa empleando como sustrato almidón; sin embargo, se evidenciaron limitantes para el uso del reactivo de Lugol en medio básico y a temperaturas mayores a 90°C. Las condiciones establecidas para llevar a cabo el método de Lugol, se priorizan con la preparación del reactivo de Lugol, para el cual la relación de proporción mínima con respecto a la concentración en % p/v, que asegura su solubilización en agua, fue de 1:5, mientras que la concentración máxima del reactivo de Lugol a evaluar para garantizar valores de absorbancia inferiores a la unidad fue de 2 % p/v de I₂ y 10% p/v de KI; con respecto al reactivo de Lugol, se reporta además que la concentración de yodo molecular en él está supeditada a la cantidad de yoduro (I⁻) proveniente de KI en solución; a su vez, se concluye por medio del análisis estadístico en el cual el valor de F umbral para la variación de I₂ fue 50 veces mayor comparado con el obtenido para la variación de KI en la solución I₂:KI, que es la cantidad de yodo (I₂) quien determina la formación del complejo

yodo-almidón, ya que si esta aumenta, se favorece la conformación de complejos yodo-almidón con poliyoduros I_3^- e I_5^- , sin embargo para soluciones de $I_2:KI$ de relaciones de proporción en concentraciones %p/v de 1:7 y 1.5, cuando la cantidad de I_2 aumentó en presencia de cantidades menores de iones I^- se propició la formación de complejos yodo-almidón con poliyoduros de cadenas más extensas como I_9^{3-} , I_{11}^{3-} , I_{13}^{3-} o I_{15}^{3-} .

Adicionalmente para el método de Lugol se construyó una curva de calibración ($R^2=0.999$) elaborada con un reactivo de Lugol ([0.658 M] 1.5% p/v de I_2 y 10% de KI) y soluciones de almidón a concentraciones de 0.0025, 0.0050, 0.0075, 0.01 % p/v, por consiguiente para la aplicación del ensayo se establece un procedimiento en el cual se emplean inicialmente 10 μ L del reactivo de Lugol y 2.99 mL de la solución de almidón (con el fin de evitar interferencias), enseguida se calienta la solución a temperatura óptima de la enzima durante 15 minutos, posterior a ello se agrega 1 mL de enzima y con 990 μ L de una solución de HCl 0.1M se detiene la reacción, por último se mide la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

Por otra parte, se utilizaron 185 semillas de la especie *Zea Mays L*, ICA V.305, registro de distribuidor:1233/12022019, con un porcentaje de emergencia de 64.86% aproximadamente 1.31 veces menor que el reportado, por ello se emplearon 120 semillas germinadas para la extracción y a partir de ellas se obtuvo 422.5 mL de extracto crudo que contiene α -amilasa, con una concentración de proteínas correspondiente a 12.51 μ g/mL, valor obtenido mediante el método Bradford ($R^2=0.9969$).

De la evaluación de la variación de temperatura, pH y concentración de enzima, se concluye que la temperatura óptima de α -amilasa extraída de *Zea Mays L* es de 80°C, su pH óptimo es de 6 y presenta un comportamiento lineal ($y= 0.0865x - 0.0857$, $R^2=0.9987$) que indica que conforme se aumente la concentración de enzima, aumentará la actividad enzimática de la misma;

teniendo en cuenta los anteriores parámetros, variando la concentración de sustrato en la reacción, según el modelo enzimático de Michaelis-Menten y la linealización Lineweaver-Burk del mismo, se obtuvieron las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$, con valores de 0.04624% p/v (3.681×10^{-5} M) y 1.497% p/v (1.191×10^{-3}) respectivamente. Finalmente, se determinó la actividad de α -amilasa a pH 6 y 80°C empleando el método de Lugol y método DNS, para los cuales se obtuvo un valor de 7.709 U/mL^{-1} y 1.677 U/mL^{-1} , respectivamente, que se compararon, apreciando así una diferencia en las actividades de α -amilasa a condiciones muy similares, y se explica debido a la poca especificidad del método DNS, en el que, la cantidad de azúcares reductores (o unidades de glucosa) detectada por el método fue menor, debido a esto se estima que el método de Lugol es mucho más específico para la determinación de la acción de α -amilasa.

Referencias Bibliográficas

- AgroInsumos S.A.S. (2018). *Federación nacional de cultivadores de cereales y leguminosas - FENALCE*. (CGD Agencia). <http://www.agroinsumossa.com/cultivo-del-maiz-en-colombia/#:~:text=En%20el%20a%C3%B1o%202017%2C%20los,del%20Cauca%20con%2018.975%20hect%C3%A1reas.>
- Aljabi, H. R. (2014). Characterization of α -amylase in wheat and maize (doctoral thesis). Georg-August-University, Göttingen, Germany. <https://ediss.uni-goettingen.de/handle/11858/00-1735-0000-0028-872A-7?locale-attribute=en>.
- Atwell, W., & Thomas, D. (1999). *Starches Handbook* (Vol. 5). Eagan Press.
- Awata, L. A., Tongoona, P., Danquah, E., Ifie, B., Suresh, L., Jumbo, M., Marchelo-D'ragga, P., & Sitonik, C. (2019). Understanding tropical maize (*Zea Mays* L): The major monocot in modernization and sustainability of agriculture in sub-Saharan Africa. *International Journal of Advance Agricultural Research*, 7(2), 32-77. doi:10.33500/ijaar.2019.07.004
- Bewley, J. D., Bradford, K., Hilhorst, H., & Nonogaki, H. (2013). *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy* (third ed.). Springer. doi:10.1007/978-1-4614-4693-4
- Bhatnagar, A., Maharda, N., Ambardar, V., Dham, D., Magdum, M., & Sankar, R. (1997). Iodine Loss From Iodised Salt on Heating. *Indian Journal of Pediatrics*, 64(6), 883-885. doi:10.1007/BF02725517
- Biazus, J. P., Rodrigues de Souza, R., Espinosa Márquez, J., Teixeira Franco, T., Curvelo Santana, J. C., & Basile Tambourgi, E. (2009). Production and Characterization of Amylases from

- Zea Mays Malt. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(4), 991-1000.
doi:10.1590/S1516-89132009000400024
- Bisswanger, H. (2017). *Enzyme Kinetics: Principles and Methods* (third ed.). Wiley VCH.
<https://doi.org/10.1002/9783527806461.ch3>
- Bolivar, G. (2019). *Lifeder*. Fosfato de calcio (Ca₃(PO₄)₂): estructura, propiedades y usos.
<https://www.lifeder.com/fosfato-de-calcio/>
- Brady, P., & Macnaughtan, M. (2015). Evaluation of colorimetric assays for analyzing reductively methylated proteins: Biases and mechanistic insights. *Analytical Biochemistry*, 491, 43-51.
doi:10.1016/j.ab.2015.08.027
- Buchholz, K., & Seibel, J. (2008). Industrial carbohydrate biotransformations. *Carbohydrate Research*, 343(12), 1966-1979. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.02.007>
- Carbonero, P. (1976). *Metabolismo de aminoácidos: complementos de bioquímica: industrias Agrícolas* (Vol. 38). Universidad Politécnica, E.T.S., y Ingenieros Agrónomos de Madrid.
<http://oa.upm.es/54141/1/ENZIMAS.pdf>
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., & Tang, M. C. (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1527-1534. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.016>
- Copeland, R. (1994). *Methods for Protein Quantitation*. Springer Science+Business Media.
doi:10.1007/978-1-4757-1505-7_3
- Dixon, M., & Webb, E. (2014). *Enzymes* (second ed.). Elsevier.
https://books.google.com.co/books?id=0PnJCgAAQBAJ&pg=PA54&hl=es&source=gbs_toc_r&cad=4#v=onepage&q&f=false
- Du, X., An, H., Liu, Z., Yang, H., & Wei, L. (2014). Probing Starch-Iodine Interaction by Atomic Force Microscopy. *Scanning*, 36(4), 394-400. <https://doi.org/10.1002/sca.21131>

- Dziedzic, S., & Kearsley, M. (1995). The technology of starch production. In S. Dziedzic, & M. Kearsley, *Handbook of Starch Hydrolysis Products and their Derivatives*. Chapman & Hall. <https://www.springer.com/gp/book/9780751402698#aboutBook>
- El-Fallal, A., Dohara, M. A., El-sayed, A., & Omar, N. (2012). Starch and Microbial α -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications. In C. F. Chang, *Carbohydrates: Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology* (pp. 459-488). IntechOpen. doi:10.5772/51571
- Ellis, R. P., Cochrane, M. P., Dale, M. F., Duffus, C. M., Lynn, A., Morrison, I. M., Prentice, D. M., Swanston, J. S., & Tiller, S. A. (1999). Starch Production and Industrial Use. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 77(3), 289-311. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199807\)77:3<289::AID-JSFA38>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199807)77:3<289::AID-JSFA38>3.0.CO;2-D)
- Espinel, E., & López, E. (2009). Purificación y caracterización de α -amilasa de *Penicillium Commune* Producida Mediante Fermentación en Fase Sólida. *Revista Colombiana de Química*, 38(2), 191-208. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/13396/14151>
- Francomano & Picardi SRL. (2017). *Producción mundial de maíz 2016/2017*. <http://www.francomanopicardi.com.ar/noticias/produccion-mundial-maiz.aspx>
- French, D. (1973). Chemical and Physical Properties of Starch. *Journal of Animal Science*, 37(4), 1048-1061. <https://doi.org/10.2527/jas1973.3741048x>
- French, D. (1981). Amylases: Enzymatic Mechanisms. In A. Hollaender, R. Rabson, P. Rogers, A. San Pietro, R. Valentine, & R. Wolfe, *Trends in the Biology of fermentations for Fuels and Chemicals* (pp. 151-182). Plenum Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3980-9_10

- García López, J., Ruiz, N., Lira, R., Vera, I., & Méndez, B. (2016). Técnicas Para Evaluar Germinación, Vigor y Calidad Fisiológica de Semillas Sometidas a Dosis de Nanopartículas. *CIQA Repositorio*, 129-140. <https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/334/1/T%C3%A9cnicas%20Para%20Evaluar%20Germinaci%C3%B3n%20Vigor%20y%20Calidad%20Fisiol%C3%B3gica%20de%20Semillas%20Sometidas%20a%20Dosis%20de%20Nanopart%C3%ADculas.pdf>
- Goering, K. J., & Eslick, R. (1978). *Estados Unidos Patent No. 4.116.770*. <https://patentimages.storage.googleapis.com/7e/1d/f1/edd57ca5af2603/US4116770.pdf>
- Greenwood, C. T., MacGregor, A. W., & Milne, E. A. (1965). The α -Amylolysis of Starch. *Starch*, 17(7), 219-225. <https://doi.org/10.1002/star.19650170703>
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V., & Chauhan, B. (2003). perspective, Microbial α -amylases: a biotechnological. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599, 1616. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)
- Holló, J., & Szejtli, J. (1957). The Mechanism of Starch-Iodine Reaction. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 1, 141-145. <https://pp.bme.hu/ch/article/download/3724/2829/>
- Intagri S.C. (2016). *Los Procesos de Germinación y Emergencia en el Cultivo de Maíz*. <https://www.intagri.com/articulos/cereales/procesos-de-germinacion-y-emergencia-en-el-cultivo-de-maiz>
- Kadziola, A., Abe, J.-i., Svensson, B., & Haser, R. (1994). Crystal and Molecular Structure of Barley α -Amylase. *Journal of Molecular Biology*, 239(1), 104-121. doi:10.1006/jmbi.1994.1354

- Kadziola, A., Sogaard, M., Svensson, B., & Haser, R. (1998). Molecular Structure of a Barley α -Amylase-Inhibitor Complex: Implications for Starch Binding and Catalysis. *Journal of Molecular Biology*, 278(1), 205-217. doi:10.1006/jmbi.1998.1683
- Kaphalia, B. S. (2014). Biomarkers of acute and chronic pancreatitis. In R. C. Gupta, *Biomarkers in Toxicology* (pp. 279-289). Academic Press. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00016-6
- Karim, A. A., Norziah, M. H., & Seow, C. C. (2000). Methods for the study of starch retrogradation (Review). *Food Chemistry*, 71(1), 9-36. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00130-8
- Kiba, N. (2005). Enzymes in Physiological Samples. In P. Worsfold, A. Townshend, & C. Poole, *Encyclopedia of Analytical Science* (pp. 536-544). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00144-8
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford Method for Protein Quantitation. In J. Walker, *Protein Protocols Handbook* (pp. 17-24). Humana Press. doi:10.1385/1-59259-169-8:15
- Kuriki, T., & Imanaka, T. (1999). The Concept of the α -Amylase Family: Structural Similarity and Common Catalytic Mechanism (Review). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(5), 557-565. https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80114-5
- Lehninger, M. (2009). *Principios de Bioquímica* (5th ed.). (D. Nelson, Ed.) Freeman and Company.
- Lowe, M. E. (2004). Amylase. In L. R. Johnson, *Encyclopedia of Gastroenterology* (pp. 57-58). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00025-3
- Manion, B. A., Holbein, B. E., Marcone, M. F., & Seetharaman, K. (2010). A new method for quantifying iodine in a starch-iodine matrix. *Carbohydrate Research*, 345(18), 2698-2704. https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.09.025

- Martín-Sánchez, M., Martín-Sánchez, M. T., & Pinto, G. (2013). Reactivo de Lugol: Historia de su descubrimiento y aplicaciones didácticas. *Educación Química*, 24(1), 31-36. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2013000100006
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *ACS Publications*, 31(3), 426-428. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac60147a030>
- Mohamed, S. (2000). α -Amylase from developing embryos of the camel tick *Hyalomma dromedarii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 126(1), 99-108. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00165-6](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00165-6)
- Moulay, S. (2013). Molecular Iodine/polymer complexes (Review). *Journal of Polymer Engineering*, 33(5), 389-443. doi:10.1515/polyeng-2012-0122
- Muralikrishna, G., & Nirmala, M. (2005). Cereal α -amylases-an overview. *Carbohydrate Polymers*, 60(2), 163-173. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.12.002>
- Najafpour, G. D. (2015). *Biochemical Engineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63357-6.00005-5>
- Nguyn, Q., Rezessy-Szabó, J., Claeysens, M., Stals, I., & Hoschke, A. (2002). Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(3), 345-352. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00128-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00128-X)
- Nielsen, J. E., Beier, L., Otzen, D., Borchert, T. V., Frantzen, H. B., Andersen, K. V., & Svendsen, A. (1999). Electrostatics in the active site of an α -amylase. *European Journal of Biochemistry*, 264(3), 816-824. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00664.x>

- Nirmala, M., & Muralikrishna, G. (2003). Three alpha-amylases from malted finger millet (Ragi, Eleusine coracana, Indaf-15)- purification and partial characterization. *Phytochemistry Letters*, 62(1), 21-30. doi:10.1016/s0031-9422(02)00443-0
- Noble, J., & Bailey, M. (2009). Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, 463, 73-95. doi:10.1016/s0076-6879(09)63008-1
- Pérez, J., & Noriega, M. (n.d.). Fisiología General. *Enzimas*. Universidad de Cantabria, Santander, España. <https://ocw.unican.es/pluginfile.php/879/course/section/967/Tema%25202B-Bloque%2520I-Enzimas.pdf>
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., & Job, D. (2011). Seed Germination and Vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 507-533. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105550
- Roskoski, R. (2015). Michaelis-Menten Kinetics. *Reference Module in Biomedical Sciences*, 1-2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05143-6>
- Rydberg, E. H., Li, C., Maurus, R., Overall, C. M., Brayer, G. D., & Withers, S. G. (2002). Mechanistic Analyses of Catalysis in Human Pancreatic R-Amylase: Detailed Kinetic and Structural Studies of Mutants of Three Conserved Carboxylic Acid. *Biochemistry*, 41(13), 4492-4502. doi:10.1021/bi011821z
- Saini, R., Saini, H. S., & Dahiya, A. (2017). Amylases: Characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 1865-1871. <https://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue4/PartAA/6-4-407-141.pdf>
- Sanwo, M., & DeMason, D. (1992). Characteristics of α -Amylase during Germination of Two High-Sugar Sweet Corn Cultivars of Zea Mays L. *Plant Physiology*, 99(3), 1184-1192. doi:10.1104/pp.99.3.1184

- Sigma-Aldrich. (2021). *MSDS. Lugol Solution.*
<https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CO&language=en&productNumber=L6146&brand=SIGMA&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fl6146%3Flang%3Den>
- Solís, C. A., Vélez, C. A., & Ramírez, J. S. (2017). Tecnología de membranas: Ultrafijación. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 11(22), 26-36.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-83672017000200026
- Sramkova, Z., Gregová, E., & Sturdík, E. (2009). Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, 2(1), 115-138.
https://www.researchgate.net/publication/292395561_Chemical_composition_and_nutritional_quality_of_wheat_grain
- Svensson, B. (1994). Protein engineering in the α -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Molecular Biology*, 25, 141-157.
<https://doi.org/10.1007/BF00023233>
- Talens Perales, D., Marín Navarro, J., & Polaina, J. (2016). Enzymes: Functions and Characteristics. In B. Caballero, P. M. Finglas, & T. Fidel, *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 532-538). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00256-7
- Taniguchi, H., & Honnda, Y. (2009). Amylases. In M. Shaechter, *Encyclopedia of Microbiology* (tercera ed., pp. 159-162). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00130-9>
- Terra, W. R., & Ferreira, C. (2005). Biochemistry of Digestion. In L. I. Gilbert, K. Latrou, & S. S. Gill, *Comprehensive Molecular Insect Science* (pp. 171-224). Elsevier. doi:10.1016/B0-44-451924-6/00053-3

- Tomasik, P., & Horton, D. (2012). Enzymatic Conversions of Starch. In D. Barker, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Vol. 68, pp. 59-436). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396523-3.00001-4>
- Valls, C., Rojas, C., Pujadas, G., Garcia-Vallve, S., & Mulero, M. (2012). Characterization of the Activity and Stability of Amylase from Saliva and Detergent: laboratory practicals for studying the activity and stability of amylase from saliva and various commercial detergents. *Biochemistry and Molecular*, 40(4), 254-265. doi:10.1002/bmb.20612
- Vera, L. (2007). Enzimas: Qué son y para qué sirven. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y naturales de Zaragoza*, 101(2), 399-417. <https://rac.es/ficheros/doc/00552.pdf>
- Visvanathan, R., Qader, M., Jayathilake, C., Jayawardana, B. C., Liyanage, R., & Sivakanesan, R. (2020). Critical review on conventional spectroscopic α -amylase activity detection methods: merits, demerits, and future prospects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(7), 2836-2847. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10315>
- Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., & Wang, S. (2015). Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 568-585. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12143>
- Warner, D., Grove, M., & Knutson, C. (1991). Isolation and Characterization of α -Amylases from Endosperm of Germinating Maize. *American Association of Cereal Chemists*, 68(4), 383-390. <https://www.semanticscholar.org/paper/Isolation-and-characterization-of-%CE%B1-amylases-from-Warner-Grove/5e85e324f8b285c014d3c77df6b8d1e9609e98dc>

WebQC.Org. (2021). *Balance Chemical Equation - Online Balancer.*

<https://www.webqc.org/balance.php?reaction=I3%2BNaOH%3DNaI%2BH2O%2BNaIO>

3

Whistler, R. L., & Daniel, J. R. (2000). Starch. In K. Othmer, *Encyclopedia or Chemical Technology* (pp. 492-507). John Wiley & Sons.

<https://doi.org/10.1002/0471238961.1920011823080919.a01>

Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2006). A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*, 351(1), 146-148.

doi:10.1016/j.ab.2006.01.036

Yu, X., Hotman, C., & Atalla, R. (1996). The complex of amylose and iodine. *Carbohydrate*

Research, 292, 129-141. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(96\)91037-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(96)91037-X)

Apéndices

Apéndice A. Datos de las soluciones I₂:KI elaboradas en ensayos preliminares.

Tabla A1

Datos de las soluciones I₂:KI elaboradas en ensayos preliminares.

Muestra	I ₂ (mol)	KI (mol)	I ₂ (% p/v)	KI (% p/v)	Proporción	Concentración de yodo (M)
1	9.45x10 ⁻⁵	5.18x10 ⁻⁴	0.48	1.72	1:4	0,122
2	3.11X10 ⁻⁴	2.47X10 ⁻³	1.58	8.22	1:5	0,557
3	1.54x10 ⁻⁴	5.06x10 ⁻⁴	0.78	1.68	1:2	0,132
4	8.67X10 ⁻⁵	1.23X10 ⁻³	0.44	4.08	1:10	0,263
5	7.88x10 ⁻⁵	2.72x10 ⁻³	0.40	9.02	1:20	0,559
6	9.46X10 ⁻⁵	4.87X10 ⁻³	0,48	16,18	1:34	0,994
7	1.81x10 ⁻⁴	4.83x10 ⁻³	0,92	16,04	1:17	1,002
8	2.28X10 ⁻⁴	4.83X10 ⁻³	1,16	16,02	1:14	1,011
9	3.23x10 ⁻⁴	4.86x10 ⁻³	1,64	16,12	1:10	1,036
10	4.06X10 ⁻⁴	4.90X10 ⁻³	2,06	16,26	1:8	1,061

Apéndice B. Información del proceso de germinación de las semillas *Zea Mays L.*

Tabla B1

Información del proceso de germinación de las semillas Zea Mays L.

Peso inicial (g)	Peso final (g)	Hidratación (%)	Peso algodón (g)	Peso germinación (g)	Montaje	Semillas germinadas	Semillas no germinadas
1,736	2,179	25,22	3,006	1,516	A	3	2
2,088	2,457	17,67	3,061	2,962	B	5	0
1,860	2,236	20,21	3,033	2,512	C	5	0

1,640	2,087	27,26	3,028	1,371	D	3	2
1,806	2,162	19,71	3,015	2,019	E	4	1
2,065	2,583	25,08	3,014	2,712	F	5	0
1,670	2,013	20,54	3,015	1,936	G	4	1
1,852	2,217	19,71	3,034	2,477	H	5	0
1,860	2,207	18,66	3,008	2,182	I	4	1
1,882	2,225	18,22	3,028	2,700	J	5	0
1,619	1,988	22,79	3,024	2,227	K	5	0
2,102	2,576	22,55	3,015	2,964	L	5	0
1,543	1,908	23,65	3,022	0,907	M	2	3
1,965	2,371	20,66	3,001	2,768	N	5	0
2,055	2,436	18,54	3,003	1,702	Ñ	3	2
1,795	2,073	15,49	3,005	1,514	O	3	2
2,196	2,721	23,91	3,035	3,150	P	5	0
1,801	2,151	19,43	3,030	1,066	Q	2	3
1,615	1,928	19,38	3,000	1,820	R	4	1
1,626	1,981	18,58	3,017	1,135	S	3	2
1,778	2,314	30,15	3,040	2,016	T	4	1
2,037	2,481	21,80	3,028	2,316	U	4	1
1,635	2,020	23,55	3,019	0,484	V	1	4
1,928	2,454	27,28	3,033	0,589	W	1	4
1,698	2,060	21,32	3,016	0,453	X	1	4
2,130	2,629	23,43	3,032	2,418	Y	4	1
1,774	2,173	22,49	3,046	1,038	Z	2	3
1,906	2,347	23,14	3,009	1,653	1	3	2
1,531	1,915	25,08	3,006	0,882	2	2	3
2,097	2,634	25,61	3,010	2,381	3	4	1
1,917	2,472	28,95	3,003	0,537	4	1	4
1,800	2,148	19,33	3,024	0,991	5	2	3
1,765	2,150	21,81	3,010	0,482	6	1	4
1,948	2,373	21,82	3,011	0,579	7	1	4
1,681	2,116	25,88	3,008	1,907	8	4	1
1,862	2,323	24,76	3,021	1,650	9	3	2

1,651	2,075	25,68	3,017	0,965	10	2	3
-------	-------	-------	-------	-------	----	---	---

Apéndice C. Análisis estadístico para variación de la concentración de las soluciones I₂:KI.

Tabla C1

Verificación de varianza y prueba de normalidad.

	Prueba	Valor-P	Prueba	Estadístico	Valor – P
Levene´s	1.47396	0.301501	Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.986842	0.780441
				0.923077	0.463263
				0.881068	0.327548

Nota. Obtenido de Statgraphics

Tabla C2

Análisis estadístico de ANOVA.

Fuente	Suma de cuadrados	Gi	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.152172	2	0.0760861	1311.83	0.0000
Intra grupos	0.000348	6	0.000058	-	-
Total (corr.)	0.15252	8	-	-	-

Nota. Obtenido de Statgraphics

Apéndice D. Análisis estadístico para la variación de KI en la solución I₂:KI.

Tabla D1

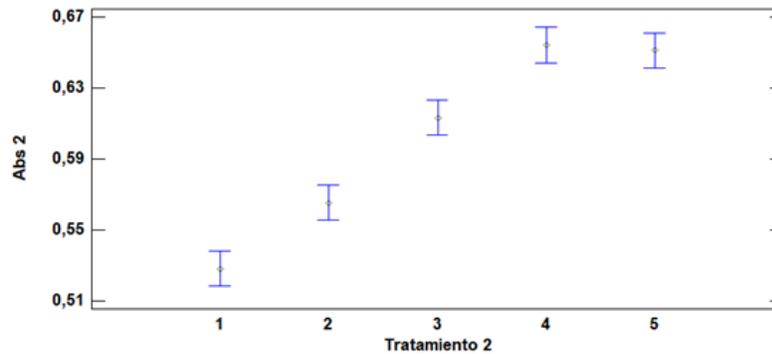
Análisis estadístico de ANOVA.

Fuente	Suma de cuadrados	Gi	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0363611	4	0.00909027	75.84	0.0000
Intra grupos	0.0019867	10	0.000119867		
Total (Corr.)	0.0375597	14			

Nota. Obtenido de Statgraphics

Figura D1

Gráfica de medias y 95,0% de Fisher LSD.



Nota. Obtenido de Statgraphics

Apéndice E. Análisis estadístico para la variación de I₂ en la solución I₂:KI.

Tabla E1

Análisis estadístico de ANOVA.

Fuente	Suma de cuadrados	Gi	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.590754	4	0.147689	3955.94	0.0000
Intra grupos	0.000373333	10	0.000037333		
Total (Corr.)	0.591127	14			

Nota. Obtenido de Statgraphics

Tabla E2

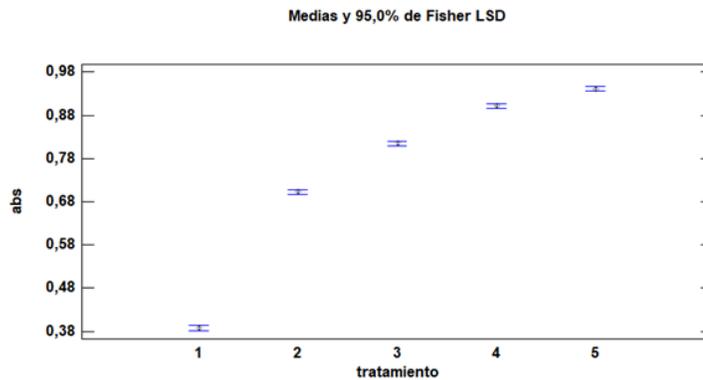
Verificación de varianza y prueba de normalidad.

	Prueba	Valor-P	Prueba	Estadístico	Valor - P	
Levene's	1.07233	0.419792	Shapiro-Wilk	0.989726	0.806082	
				Estadístico W de	0.964286	0.636887
				0.986842	0.780441	
				0.93232	0.497362	
				0.892857	0.363113	

Nota. Obtenido de Statgraphics

Figura E1

Gráfica de medias y 95,0% de Fisher LSD.



Nota. Obtenido de Statgraphics

Apéndice F. Datos obtenidos para las curvas de calibración de las soluciones I₂:KI.

Tabla F1

Desviaciones estándar y absorbancias.

Solución I ₂ :KI	Concentración almidón (%p/v)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar
2	0	0	0	0	0	0
	0.0025	0.1755	0.1754	0.1749	0.1753	0.0003215
	0.0050	0.3504	0.3529	0.3564	0.3532	0.003014
	0.0075	0.4972	0.4901	0.5085	0.4986	0.009279
	0.010	0.6250	0.6306	0.6410	0.6322	0.008119
3	0	0	0	0	0	0
	0.0025	0.2087	0.2114	0.2081	0.2094	0.001758
	0.0050	0.4022	0.4147	0.4038	0.4069	0.006802
	0.0075	0.5750	0.5725	0.5741	0.5739	0.001266
	0.010	0.7825	0.7885	0.7843	0.7851	0.003079
4	0	0	0	0	0	0
	0.0025	0.2273	0.2285	0.2292	0.2283	0.0009609
	0.0050	0.4467	0.4444	0.4495	0.4469	0.002554
	0.0075	0.6734	0.6777	0.6820	0.6777	0.004300

0.010	0.9047	0.8969	0.9101	0.9039	0.006636
-------	--------	--------	--------	--------	----------

Apéndice G. Datos obtenidos para la elaboración de la curva de calibración del método**Bradford****Tabla G1***Desviaciones estándar y absorbancias.*

<i>Concentración BSA ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Absorbancia 1</i>	<i>Absorbancia 2</i>	<i>Absorbancia 3</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación estándar</i>
0	-	-	-	-	-
12.9	0.2283	0.1883	0.1943	0.2036	0.02157
19.3	0.2988	0.2952	0.3036	0.2992	0.004214
25.8	0.3605	0.3730	0.3985	0.3773	0.01937
32.3	0.4637	0.4591	0.4661	0.4630	0.003557
38.7	0.5297	0.5307	0.5303	0.5302	0.0005033
Muestra	0.1856	0.1882	0.1922	0.1886	0.003324

Apéndice H. Datos obtenidos para la variación de la concentración de enzima.**Tabla H1***Desviaciones estándar y absorbancias.*

<i>Concentración de proteína ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Absorbancia 1</i>	<i>Absorbancia 2</i>	<i>Absorbancia 3</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>Velocidad de reacción (U)</i>
1.661	0.7077	0.9922	0.8289	0.8429	0.1428	0.05733
3.323	0.6374	0.6606	0.7009	0.6663	0.03213	0.1976
4.985	0.6595	0.6945	0.7155	0.6898	0.02829	0.3541
6.646	0.2442	0.2993	0.2945	0.2793	0.03052	0.4768
8.308	0.3146	0.2721	0.2663	0.2843	0.02637	0.6352
5.538	0.5057	0.6322	0.7435	0.6271	0.1190	0.3981

Apéndice I. Datos obtenidos para la variación del pH.**Tabla I1***Desviaciones estándar y absorbancias.*

<i>pH</i>	<i>Absorbancia 1</i>	<i>Absorbancia 2</i>	<i>Absorbancia 3</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación estándar</i>
3	0.7995	0.7770	0.6365	0.7377	0.08833
4	0.7489	0.6169	0.6589	0.6749	0.06744
5	0.6496	0.6749	0.7706	0.6984	0.06382
6	0.5057	0.6322	0.7435	0.6271	0.1190
7	0.3521	0.3996	0.3015	0.3511	0.04906

Apéndice J. Datos obtenidos para la variación de la temperatura.**Tabla J1***Desviaciones estándar y absorbancias.*

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Absorbancia</i> <i>1</i>	<i>Absorbancia</i> <i>2</i>	<i>Absorbancia</i> <i>3</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación</i> <i>estándar</i>
20	0.4639	0.4934	0.5352	0,4975	0,03583
30	0.6679	0.6729	0.9270	0,7559	0,1482
40	0.5619	0.6120	0.4781	0,5507	0,06765
50	0.5057	0.6322	0.7435	0,6271	0,1190
60	0.4664	0.4405	0.4045	0,4371	0,03108
70	0.7625	0.7085	0.7676	0,7462	0,03275
80	0.2045	0.2273	0.2242	0,2187	0,01237
90	0.4383	0.3921	0.4125	0,4143	0,02315

Apéndice K. Datos obtenidos para las curvas de progreso.**Tabla K1***Desviaciones estándar y absorbancias.*

<i>[Sustrato]</i> (%p/v)	<i>Abs 1</i>	<i>Abs 2</i>	<i>Abs 3</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación</i> <i>estándar</i>	<i>Tiempo</i> (s)
0.20	0.6973	0.6104	0.6243	0.6440	0.04668	10
	0.2045	0.2273	0.2242	0.2187	0.01237	15
	0.1848	0.2127	0.2000	0.1992	0.01397	30
0.30	0.8540	0.8592	0.9473	0.8868	0.05243	20
	0.6569	0.6147	0.5704	0.6140	0.04325	35
	0.3588	0.3351	0.3125	0.3355	0.02315	45
0.40	0.8770	0.9460	0.9417	0.9216	0.03865	30
	0.6195	0.6205	0.5749	0.6050	0.02604	50
	0.4727	0.3753	0.3934	0.4138	0.05180	60
0.50	0.8020	0.7628	0.8025	0.7891	0.02278	40
	0.5831	0.5962	0.5608	0.5800	0.01790	50
	0.3023	0.3879	0.4395	0.3766	0.06930	60
0.60	0.9788	0.9857	0.9535	0.9727	0.01695	40
	0.5384	0.6102	0.5893	0.5793	0.03693	50
	0.3589	0.3175	0.3475	0.3413	0.02138	60

Apéndice L. Datos obtenidos para la curva de calibración del método DNS.**Tabla L1***Desviaciones estándar y absorbancias.*

<i>concentración de</i> <i>glucosa (mM)</i>	<i>Absorbancia</i> <i>1</i>	<i>Absorbancia</i> <i>2</i>	<i>Absorbancia</i> <i>3</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación</i> <i>estándar</i>
0.3	0.2410	0.2506	0.2706	0.2541	0.01510
0.4	0.3956	0.4102	0.4001	0.4020	0.007476

0.5	0.5592	0.5484	0.5527	0.5534	0.005437
0.6	0.7305	0.7165	0.7150	0.7207	0.008549
0.7	0.8875	0.9170	0.8773	0.8939	0.02062
Extracto crudo	0.3606	0.3674	0.3646	0.3642	0.003418
muestra	0.4964	0.4834	0.4848	0.4882	0.007136