

ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA  
EN EL PROCESO DE LA GERMINACIÓN. II

AMILASAS ALFA Y BETA EN HÍBRIDOS Y VARIEDADES  
DE MAÍZ MEXICANO

Por JUAN ROCA y RAUL ONDARZA,  
del Instituto de Biología.

En trabajo anterior nos hemos ocupado del estudio de dos actividades enzimáticas como son la sacarogénica y la proteolítica del frijol. En este trabajo estudiamos la actividad amilásica, tanto dextrinogénica o alfa amilásica como la sacarogénica, producto de la beta amilasa, en semillas secas y germinadas de híbridos y variedades de maíces mexicanos.

Es de todos conocida la importancia tan grande que merece el cultivo del maíz en México, y es por esto que se ha creado un organismo formado por la Secretaría de Agricultura y Ganadería y la Oficina de Estudios Especiales de la Fundación Rockefeller, que se encarga de seleccionar y obtener variedades e híbridos que den un máximo rendimiento por hectárea y con un ciclo vegetativo de corta duración, además de conseguir por medio de la Genética semillas que den plantas resistentes a las plagas y a las sequías. Las semillas que hemos estudiado tienen esa procedencia y han sido proporcionadas por la Comisión del Maíz.<sup>1</sup>

Es bien conocido que existen fermentos apropiados para la hidrólisis del almidón almacenado en la semilla que el embrión aprovecha en la germinación; estos fermentos, que se denominan alfa y beta

---

<sup>1</sup> Agradecemos a la Comisión del Maíz haber proporcionado las muestras de semillas que han servido para este estudio.

amilasa, se encuentran en la planta en dos formas que pueden ser determinadas por su actividad y que se denominan "libre" y "combinada". A la primera se le denomina también amilosa activa y a la segunda latente, pues aquélla es la que tiene actividad inmediata en los tejidos del vegetal, mientras que ésta se halla unida en combinación compleja y por lo tanto es inactiva; probablemente por medio de las propias proteasas del vegetal va siendo liberada a medida que germina la semilla, para transformarse en enzima activa, hasta llegar el momento en que toda la enzima se encuentra bajo la única forma de libre. Por otra parte, como se ve en este trabajo, no sólo sucede esto, sino que también la actividad enzimática, ya sea de la alfa o beta amilasa, no sólo aumenta la actividad libre, sino la suma de ésta y la combinada, por lo que existe una actividad que podemos llamar total y que en el laboratorio se estudia haciendo actuar sobre los extractos cierta cantidad de papaína por 24 horas, con el objeto de liberar el fermento latente, y luego se determina la actividad por el método que se citará en su oportunidad. Este aumento creemos que sea debido a una síntesis de la enzima que tiene lugar en el proceso de germinación.

Hemos aceptado para la valoración de la actividad de la alfa y beta amilasas las unidades enunciadas por Kneen y Sandsted, por considerar conveniente la unificación del criterio de los distintos investigadores y poder comparar los resultados obtenidos. De acuerdo con dichos autores se denominan:

**Unidades de alfa amilasa** o alfa dextrinogénica, los gramos de almidón soluble que, en exceso de beta amilasa, son dextrinizados por un gramo de malta en una hora a 30°.

**Unidad sacarogénica**, los gramos de almidón soluble convertidos a maltosa por un gramo de malta en una hora a 30°.

**Unidades de beta amilasa**, los gramos de almidón soluble convertidos a maltosa por la beta amilasa de 1 gramo de malta en una hora a 30°.

### Materiales y métodos

Como material de estudio hemos escogido 12 híbridos y 5 variedades que proceden de distintas localidades, y aclimatadas para su desarrollo a distintas alturas sobre el nivel del mar.

La designación V indica variedad seleccionada, VS quiere decir variedad sintética, y H híbrido. Los números indican las alturas apropiadas para obtener el máximo rendimiento.

La alfa y beta amilasa libres se extraen haciendo un extracto acuoso que se deja por hora y media en B.M. a 30°, se centrifuga y filtra como en el caso anterior.

La total se extrae también por extracto acuoso al que se añade 0.1 grs. de acetato de calcio y 0.2 grs.% de papaína: se satura con toluol y se deja 24 horas en B.M. a 30°, se centrifuga y filtra como en el caso anterior.

Para valorar la alfa amilasa se prepara una solución de alfa amilodextrina, con almidón soluble al que se le añade exceso de beta amilasa y buffer apropiado; saturada con toluol se deja a la temperatura ambiente por 24 horas. A 20 ml. de esa solución se le añaden 5 ml. del extracto respectivo al 10 ó 20%, más 5 ml. de solución buffer de acetatos de pH 4.6, y después de ponerla a 30° por cierto tiempo se vierte 1 ml. de la misma a una solución yodo yodurada débil, repitiéndolo a menudo hasta que el color obtenido sea igual al de una solución tipo de dextrina tratada previamente con solución yodo yodurada.

Los cálculos se hacen de acuerdo con la fórmula:

$$\text{unidades de alfa amilasa} = \frac{0.4 \times 60}{\text{equivalente de malta usada (g)} \times \text{tiempo de dextrinización (minutos)}}$$

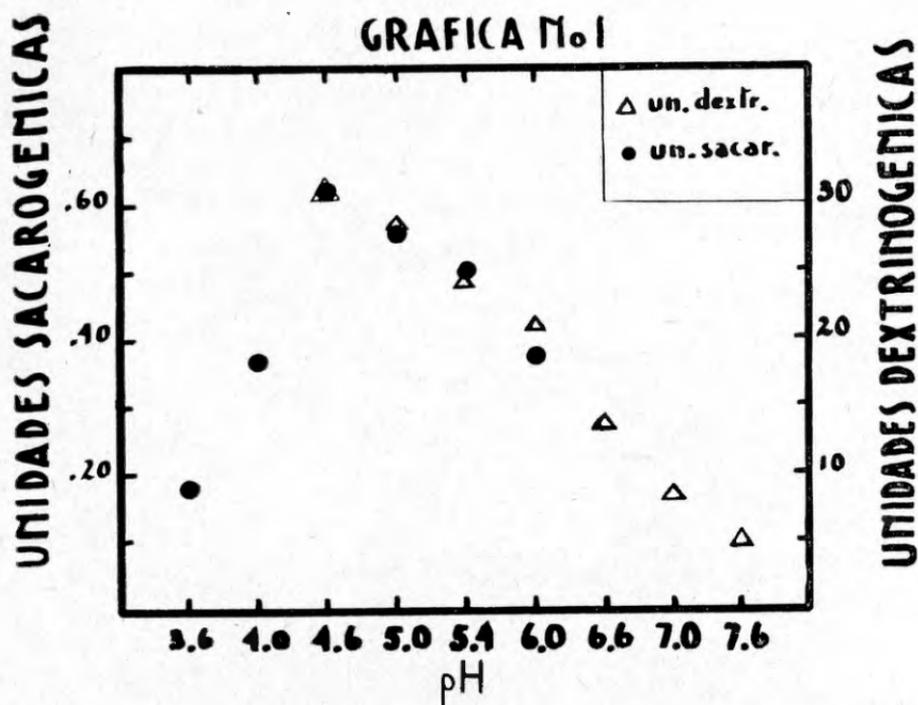
El método que nos parece más adecuado para la valoración de la beta amilasa es el de Kneen y Sandstedt, fundado en que la actividad sacarogénica corresponde a la suma de actividades alfa y beta amilásicas; por otra parte, la propiedad sacarificante de la alfa puede calcularse de su dextrinizante absoluta, de lo que se deduce que la actividad sacarogénica de la beta puede conocerse restando de la sacarogénica total la que le corresponde a la alfa amilasa.

En realidad este método fué ideado para la determinación de esa actividad en semillas como cebada y trigo, que son fuentes ricas en dicha enzima; y como el maíz es pobre en beta amilasa, no es factible valorarla por este método, por lo que decidimos cuantificar la actividad sacarogénica de acuerdo con el método que se describe al tratar de la actividad sacarogénica del frijol, advirtiendo que los mgs. de maltosa calculados a partir del ferricianuro reducido, se multiplicaron por el factor 0.95 para obtener los mgs. de almidón hi-

drolizados por 1 ml. de extracto en 30 minutos; tomando en cuenta la cantidad de extracto utilizado y el tiempo, se obtuvieron las unidades sacarogénicas.

### Parte experimental

El pH óptimo se determinó en un lote de semillas de maíz germinadas por 4 días, haciéndose la extracción y titulación a distintos



pH con buffer de acetatos y fosfatos. Los resultados se expresan en la gráfica N° 1, en que se aprecia claramente actividad máxima en el pH 4.6 para las dos amilasas.

### Semillas naturales no germinadas

Se han hecho diversos estudios a este respecto en distintas semillas, como trigo, cebada, arroz, avena y maíz, y se ha observado que

la mayoría de ellas carecen de actividad dextrinogénica, pero en lo que respecta a la sacarogénica casi todas la poseen, a excepción de las tres últimas que la tienen en muy baja proporción o carecen por completo de dicha actividad sacarogénica.

En las 17 muestras de semillas de maíz que hemos estudiado, no se ha encontrado actividad de alfa amilasa. Respecto a la beta amilasa, la mayoría de las muestras no tienen actividad por lo menos con el método que hemos seguido, excepto las siguientes: H122W, H122, H120 y H123.

Haremos resaltar que esas semillas, con actividad de beta amilasa, son precisamente, como veremos después, las que tuvieron mayor actividad a los 8 días de germinación.

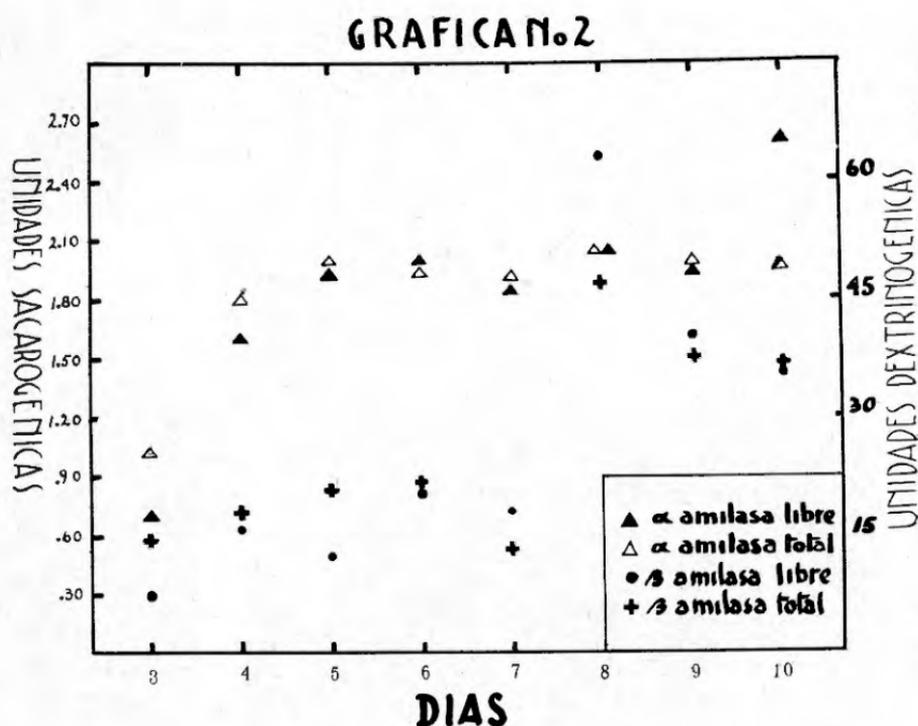
### **Actividad de amilasas "libre" y "total" en el proceso de germinación**

Antes de proceder al estudio comparativo de la actividad enzimática de las semillas del maíz, teníamos que conocer cuándo se desarrollaba la actividad máxima en el proceso de germinación. Para ello seleccionamos las muestras correspondientes a la V 7 y a la H 120 A. Con ellas se prepararon numerosos lotes en las condiciones señaladas anteriormente, y para facilitar el trabajo pensamos obtener los extractos con el maíz germinado y desecado. Así lo hicimos, comparándolo con un duplicado preparado sin previa desecación; desgraciadamente los resultados no fueron concordantes, de tal manera que el extracto obtenido con maíz germinado y desecado fué mucho menor y nulo a veces en actividad enzimática, comparado con el extracto no desecado. Haremos notar que la desecación se hizo a 39° y no se utilizó vacío. En consecuencia se estudiaron los extractos sin previa desecación.

En la gráfica N° 2 se especifican los resultados obtenidos con la actividad de alfa y beta amilasas del maíz germinado de 3 a 10 días.

En lo que respecta a la alfa amilasa, puede notarse que la actividad es baja en el 3° y 4° días; después aumenta bruscamente, y

permanece hasta cierto punto sensiblemente igual en los demás días, con pequeñas diferencias. Con la actividad de la beta amilasa sucede cosa semejante, esto es, aumenta con algunas diferencias en los primeros días, permanece después más o menos constante, hasta que al llegar al 8° día aumenta bruscamente para descender de nuevo en los días siguientes. Por lo mismo se escogió como adecuado, el desarrollo óptimo de actividad en ambas amilasas, el correspondiente al 8° día de germinación.



**Estudio comparativo de la actividad amilásica  
de 17 muestras de maíz**

Con los datos relativos al pH óptimo y al desarrollo de la máxima actividad en la germinación del maíz, se procedió al estudio comparativo de la alfa y beta amilasas, libre y total de 17 muestras de maíz. En la tabla siguiente se expresan los resultados obtenidos.

TABLA

Muestras	Altitud	Unidades Dextrinogénicas		Unidades Sacarogénicas	
		Libre	Total	Libre	Total
1.—H 120	2200-2600 m.	44	50	2.34	2.61**
2.—H 120 A	" "	43	40	2.52	1.87***
3.—H 121	" "	54	48	2.68	1.85****
4.—H 122	" "	40	58	2.14	2.86*
5.—H 122 W	" "	43	40	2.02	2.37***
6.—H 123	" "	52	44	2.31	2.40****
7.—V 7	" "	50	45	2.41	2.22**
8.—V 21	" "	33	42	1.76	2.20**
9.—VS101	" "	65	34	1.55	1.82***
10.—H 211	1800-2200 m.	35	39	1.72	1.57***
11.—H 212	" "	33	30	1.25	1.51**
12.—H 215	" "	39	48	2.32	2.57**
13.—H 301	1400-1800 m.	37	27	1.74	1.98**
14.—H 305	" "	27	29	1.05	1.05**
15.—H 306	" "	31	39	1.81	1.93**
16.—V 520	0-1000 m.	25	14	1.05	1.12**
17.— 9 W	Texas	33	21	1.74	1.73****

\* germinación mala

\*\* germinación regular

\*\*\* germinación buena

\*\*\*\* germinación muy buena

Señalaremos algunos puntos interesantes que se deducen de la atenta observación de la tabla anterior.

Aunque no disponemos de aparato adecuado para el desarrollo de las semillas a temperatura constante y siempre en las mismas condiciones, como en todos los casos germinaron las semillas en el mismo laboratorio y en períodos en que la temperatura tuvo pocas variaciones, las condiciones de desarrollo fueron semejantes. Tomando en cuenta estas circunstancias, observamos que los lotes de semillas no germinaron de manera análoga: unos lo hicieron uniformemente y con gran vigor, mientras que otras, al lado de las anteriores y en el mismo período de tiempo, germinaron irregularmente y con menos vigor.

No siempre correspondió la máxima actividad enzimática al desarrollo de las semillas. Citaremos la muestra correspondiente a 9 W, de la que germinaron todas las semillas con vigor uniforme, y sin embargo su actividad enzimática fué más bien baja.

Por otra parte, puede observarse en el cuadro general que la mayor actividad enzimática corresponde a las semillas aclimatadas para alturas de 2200 a 2600 m., excepto la H 215, que corresponde a altitudes de 1800 a 2200 m. y que tuvo actividad semejante a las

anteriores. Por lo general va descendiendo la actividad a medida que se trata de semillas aclimatadas para alturas inferiores a la señalada, y es mínima en semillas que se desarrollan normalmente al nivel del mar.

Otra cosa que nos interesa señalar es la siguiente: en muchos casos, especialmente en lo que se refiere a la alfa amilasa, se observa mayor actividad para la libre que para la total.

Además se notará que la actividad de la beta amilasa es muy baja en el maíz germinado, por lo que tuvo que modificarse el método original de Kneen y Sandsted, como se dijo antes.

### Discusión

De todo lo anterior deducimos lo siguiente: puede suponerse que el desarrollo de la planta en el proceso de germinación depende de la actividad enzimática, o bien que esa actividad es resultado del mayor desarrollo de la planta. Claro está que en esa forma es muy difícil resolver el punto a discusión, pues si por un lado hemos visto que las semillas que antes de germinar tenían una pequeña actividad de beta amilasa eran las que a los 8 días de germinación tenían mayor actividad, en otras palabras, si las semillas sólo pueden desarrollarse al principio con los productos hidrolizados por las enzimas, al obrar sobre los substratos que contiene almacenados la semilla, es natural deducir que son las enzimas los únicos agentes que influyen en el desarrollo de la planta; pero hay en ellas otros factores muy importantes, como son hormonas y vitaminas, indispensables a su vez para el crecimiento y funciones biológicas de la planta.

Estimamos, pues, que en el desarrollo de la semilla deben tomarse en cuenta hormonas, vitaminas y enzimas, a no ser que de acuerdo con la mayoría de los autores modernos se asigne a las hormonas y vitaminas un papel esencialmente enzimático. En este caso es manifiesta la interdependencia que debe haber entre esos factores, estableciéndose un equilibrio entre los mismos; de cualquier modo, es lógico que a mayor actividad enzimática ha de corresponder mayor desarrollo de la planta, porque dispone de más elementos útiles para sus funciones de crecimiento y elaboración de factores propios para su desenvolvimiento.

Por otra parte, si se toma en cuenta que el maíz es la planta que mejor aprovecha la energía solar, no se explica, aparentemente, por qué su actividad de alfa amilasa es mucho menor que la de la cebada, trigo, avena y sorgo, y todavía mucho menor la de la beta

amilasa en comparación con los cereales mencionados, tanto que se ve la necesidad de investigar procedimientos más sensibles que los de Kneen y Sandsted, que son actualmente los únicos que se usan más o menos modificados.

Esto se puede atribuir a la enorme desproporción que hay en el maíz entre el embrión y el cotiledón, mientras que en los otros cereales hay un peso relativo más estrecho; de lo que se deduce que comparando pesos iguales de los distintos cereales, hay en el maíz menor cantidad de embriones en donde se forman las enzimas que van a actuar sobre las reservas alimenticias de la semilla.

Es también muy interesante el hecho que se señaló antes, esto es, que la actividad de las amilasas libres, especialmente de la alfa, sea muchas veces igual o superior a la total, cuando es lógico que la total debería corresponder a la potencial, puesta en libertad por proteasas, más la libre. Sin embargo hay que considerar que en la semilla seca no se encontró alfa amilasa con los procedimientos usuales, de lo que se deduce que la que aparece en el proceso de germinación es elaborada en ese momento, y por lo tanto utilizada en cuanto se produce, y que si la total es menor debe ser porque se destruye en el procedimiento seguido, o bien porque es utilizada en las 24 horas que dura el proceso de extracción para dextrinizar los propios almidones que acompañan al extracto.

Respecto a la beta amilasa debe suceder cosa análoga, ya que en la semilla sin germinar se encontró muy pequeña cantidad de esa enzima y tan sólo en algunos casos. Es natural que si la enzima que se encuentra en el proceso de germinación correspondiese a la que preexistía, no se encontrarían las diferencias señaladas en este trabajo.

En lo que se refiere al hecho de que la actividad enzimática de las amilasas alfa y beta es mayor en los maíces aclimatados para alturas entre 2200 a 2600 m. sobre el nivel del mar, será útil señalar que este estudio ha sido realizado precisamente a esa altura, y por lo tanto para deducir consecuencias nos falta comprobarlo repitiendo lo mismo en distintas altitudes. Además, no conocemos si la selección de las semillas estudiadas fué hecha en todos los casos con maíz desarrollado precisamente en las respectivas altitudes, o bien en otras distintas y aclimatadas posteriormente a las que se les asigna en el cuadro general. De cualquier modo es digno de tomarse en cuenta, y sólo con datos posteriores se podrán deducir consecuencias que consideramos de gran interés.

### Conclusiones

1ª El pH óptimo de acción de alfa y beta amilasas del maíz estudiado es de 4.6.

2ª La acción óptima de amilasas alfa y beta del mismo, se encuentra alrededor de los 8 días.

3ª En el proceso de germinación del maíz se observa aumento progresivo de las amilasas dextrinogénica y sacarificante, tanto libre como total.

4ª Se observaron francas variaciones en la actividad amilásica de 17 muestras de híbridos y variedades de maíz; en las condiciones experimentales que se especifican en este trabajo, es mayor en las muestras aclimatadas para altitudes de 2200 a 2600 m. y decrece ostensiblemente a medida que desciende la altura de aclimatación.

### BIBLIOGRAFIA

- EHRNST, L. E., YAKISH G. J. and OLSON W., 1939.—Determination of alpha amylase by modified Wohlgemuth Method. *Cereal Chem.* Vol. XVI-724.
- ELION, S., 1945.—The Cereal amylases. *Baker digest*, 95.
- GEDES, W. F., 1946.—The Amylases of wheat and their significance in milling and baking technology. *Advances in Enzymology*. Vol. 6
- FRUTON, J. S., 1946.—Enzymic hydrolysis and synthesis of peptid bonds. *Currents in Biochemical Research*, 123.
- GORTNER, R. A., 1946.—Outline of Biochemistry. Second Edition.
- HOPKINS, R. H., 1946.—The actions of the amylases. *Advances in Enzymology*. Vol. 6-369.
- HILDEBRAND, F. C. and BURKERT, C. M., 1942.—Amylase and protease systems of malted wheat flour. *Cereal Chem.* Vol. XIX-27.
- KNEEN, E., 1944.—A comparative study of the development of amylases in germinating cereals. *Cereal Chem.* Vol. XXI-304.
- KNEEN E., MILLER, B. S. and SANDSTEDT, R. M., 1942.—The influence of temperature on the development of amylase in germinating wheat. *Id. Id.* Vol. XIX-2.
- KNEEN, E. and SANDSTEDT, R. M., 1941.—Beta amylase activity and its determination in germinated and ungerminated cereals. *Cereal Chem.* Vol. XVIII-237.
- KNEEN, E., BECHARD, O. C. and SANDSTEDT, R. M., 1941.—The starch degrading properties of barley malts. *Id. Id.* Vol. XVIII-741.
- LAUFER, S., TAUBER, H. and DAVID, CL. F., 1942.—The amylolytic and proteolytic activity of soybean seed. *Am. Brewer*. 23.
- OLSON, W. J., EVANS, R. and DICKSON, A., 1944.—A modification of the Kneen and Sandstedt methods for the determination of alpha beta amylases in barley malt. *Cereal Chem.* Vol. XXI-533.
- ROBERTS, L. M., WELLHAUSEN, E. J., PALACIOS DE LA R., C. y Cuevas, R. A., 1949.—Rocamex V-21 y Rocamex V S-101. *Seria. A. y G., México.*
- ROCA J. y ONDARZA, R., 1948.—Estudios sobre la actividad enzimática en el proceso de germinación. I. Actividad sacarogénica y proteolítica del frijol. *An. del Inst. de Biol.* Tomo XIX-283.
- SANDSTED, R. M., KNEEN, R. and BLISH, M. J., 1945.—Procedure for alpha amylase activity. *Cereal Chem.* Vol. XVI-712.
- WEILL, C., and CALDWELL, M. L., 1945.—The study of the essential groups of beta amylase. *Jour. Am. Chem. Soc.* 212.
- WELLHAUSEN, E. J. y ROBERTS, L. M., 1948.—Rocamex V-7. *Secretaría de Agricultura y Ganadería, México.*