

ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN EL PROCESO DE LA GERMINACION. I.

ACTIVIDAD SACAROGENICA Y PROTEOLITICA DEL FRIJOL

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

El estudio de las enzimas que existen en las semillas de diversos vegetales como el trigo, maíz, cebada, etc., es de gran interés científico tanto por el papel que desempeñan en la fisiología de estas, como por las aplicaciones que tienen en la industria, lo que puede ponerse de manifiesto por los muchos trabajos publicados que se refieren a la presencia de amilasas, proteasas y lipasas en esas semillas.

V. Dawson M. y J. Marshall N.⁹ han estudiado la acción comparativa de la amilasa sobre distintos almidones. En el mismo año de 1938, A. K. Balls y W. S. Hale² señalaron el aislamiento y propiedades de la proteinasa del trigo. M. J. Blish, R. M. Sandstedt y E. Kneen,⁵ en igual fecha, estudiaron la acción de las amilasas de cereales sobre la harina y la malta. En 1939 O. E. Stanberg y C. H. Bailey³² investigaron la acción de las amilasas sobre la amilopectina del trigo y sobre amilosa. Los mismos autores se han ocupado de la acción de las amilasas sobre el almidón de trigo natural.³¹ También en 1939 señalaron E. Stanberg y C. H. Bailey³⁰ la acción de la alfa y beta amilasa sobre la fermentación del pan. En el mismo año V. D. Martin, N. M. Naylor y R. M. Hixon²⁵ estudiaron la acción de la beta amilasa del frijol de soya sobre varios almidones. En 1940 J. M. Newton, F. F. Farley y N. M. Naylor²⁶ efectuaron estudios semejantes a los anteriores. En 1941 investigó S. R. Snider²⁹ la valoración de la beta amilasa total en la cebada y en la malta. En el mismo año

E. Kneen y R. M. Sandstedt¹⁴ se ocuparon de la actividad de la beta amilasa y de su valoración en los cereales no germinados y germinados. En 1943 J. M. Newton, R. M. Hixon y N. M. Naylor²⁷ estudiaron las amilasas del frijol de soya. En el mismo año E. Kneen, R. M. Sandstedt y C. M. Hollenbeck¹⁶ observaron la distinta estabilidad de la amilasa de malta, así como la separación de los componentes alfa y beta. E. Kneen, en 1944,¹⁷ hizo un estudio comparativo sobre el desarrollo de las amilasas en los cereales germinados. En 1948 Cleveland y Kerr⁶ investigaron la acción de la beta amilasa sobre la amilosa del maíz. Por último, A. W. Barton⁸ demostró la actividad lipolítica de las semillas de ricino y frijol de soya.

Varios investigadores se han ocupado del estudio de las amilasas de las semillas durante las fases de la germinación. Por ejemplo, Bach, Oparin y Wahner, en 1927,¹ refieren la presencia de pequeñas cantidades de enzimas activas en el trigo sin germinar, pero a la vez señalan que, a medida que se efectúa ese proceso, aumenta rápidamente la actividad amilásica hasta llegar al máximo y disminuir después en los últimos días de la germinación. Igualmente Tascher y Dungan³⁴ encontraron aumento en la actividad de las semillas de maíz germinado. Del mismo tema se han ocupado G. H. Hills y C. H. Bailey¹¹ en la semilla de cebada. R. M. Sandstedt y O. C. Beckard²⁸ han investigado fenómenos análogos en el trigo germinado.

La actividad amilásica se atribuye generalmente a dos enzimas que se designan con los nombres de alfa y beta amilasa.

R. H. Hopkins¹³ afirma que la alfa amilasa hidroliza la molécula de almidón en los enlaces alfa glucosídicos hasta dextrinas de peso molecular relativamente bajo, solubiliza dicha sustancia, destruye su capacidad de combinación con el yodo, y favorece, al mismo tiempo, la acción de otra enzima que es la beta amilasa.

La alfa amilasa, puede, en ciertas circunstancias, avanzar más en esa acción y llegar hasta maltosa y aun a glucosa, transformación que se efectúa en un 80% de almidón, de tal manera que el producto final es en su mayor parte maltosa y el resto en forma de dextrinas sencillas. Esta enzima se designa con el nombre de "dextrinogénica".

Por otro lado tenemos la beta amilasa, denominada sacarogénica por tener la cualidad de transformar el almidón puro hasta maltosa, actividad que llega a 53% en el caso de que actúe libre de alfa

amilasa. En condiciones normales la beta amilasa actúa sobre los productos liberados por la alfa amilasa.

Además hay que señalar que Lintner, en 1886,²⁰ encontró que la cebada no germinada sólo contiene beta amilasa, y Hopkins¹³ afirma que el camote, cebada, trigo y frijol de soya no germinados están en las mismas condiciones, esto es, que sólo contienen beta amilasa.

La actividad amilásica durante la germinación de las semillas, puede ser afectada por diversas condiciones del medio ambiente. Por ejemplo, E. Kneen, B. Miller y Sandstedt, en 1942,¹⁵ han encontrado diferencias notables en la relación de beta amilasa "libre y total" en granos de trigo germinados a distintas temperaturas. Posteriormente, en 1945, E. Kneen y Hads¹⁸ hallaron diferencias en la actividad amilásica del trigo y la cebada germinados con relación al medio y variedad de los granos, lo que confirman los resultados a que llegaron Hills y Bailey¹² en 1938 al estudiar las amilasas de diferentes variedades de cebada.

Ahora bien, queremos señalar en este trabajo que, cuando se hable de actividad sacarogénica, se entenderá la cantidad de maltosa formada principalmente por la beta amilasa, sin excluir la posibilidad de que a la vez actúe la alfa, aunque en menor grado.

Materiales y Métodos

El material usado por nosotros en este trabajo ha sido el **Phaseolus vulgaris**, variedades negro, palacio y chilar, germinados en cristalizadores sobre algodón empapado en agua destilada, manteniendo la humedad a saturación. Se han utilizado únicamente semillas de lotes previamente pesados; las semillas que no germinaron se desecaron hasta peso constante, y su peso se descontó del original. La temperatura a que se efectuó la germinación de los granos oscila entre 20° y 22° C.

Los extractos se hicieron conforme al método sugerido por Kneen, Miller y Sandstedt¹⁵ para la beta amilasa total, y modificado ligeramente por nosotros en la forma siguiente:

Se partió de 5 gr. de frijol finamente molido, en el caso de las pruebas hechas con semillas naturales; para las semillas germinadas se procedió a triturarlas convenientemente en un mortero hasta obtener una pasta homogénea; en los dos casos se añadió 0.2 gr. de papaína, 3.75 gr. de alundum y 100 ml. de solución buffer de acetatos. Al extracto obtenido se añadieron unas gotas de toluol, y se dejó

por 24 horas a temperatura constante de 30° en baño María. Transcurrido ese tiempo se centrifugó por 10 minutos y se filtró con papel No. 248 E. & D. Como sustrato se usó en todos los casos almidón soluble Lintner al 2% disuelto en solución de Na Cl al 30%.

Para la valoración de la actividad sacarogénica se tomaron 5 ml. del extracto anterior, se añadieron 20 ml. de la solución de almidón, o sea el sustrato y solución buffer de acetatos hasta completar el volumen de 30 ml. Todo ello se puso en baño María a 30° por una hora. Después de este tiempo se le agregaron 20 ml. de ácido sulfúrico al 1% para detener la acción enzimática. Se toman de la mezcla 5 ml. para valorar las sustancias reductoras formadas durante dicha acción, las que se cuantifican con ferricianuro 0.05 N, según método descrito por Blish y Sandstedt en 1933.⁴ La cantidad de maltosa en miligramos correspondiente al ferricianuro reducido, se calculó con ayuda de la tabla del A. O. A. C.

Los resultados se expresan en unidades sacarogénicas y en grados Lintner. Entendemos por unidad sacarogénica la cantidad de maltosa en miligramos correspondiente a la actividad amilásica de un gramo de semilla.

Los grados Lintner se obtienen multiplicando las U. S. por el factor aproximado de 7.5, según Kneen y Col. (Cereal Chem. XVIII: 741, 1941).

pH óptimo de extracción y acción.

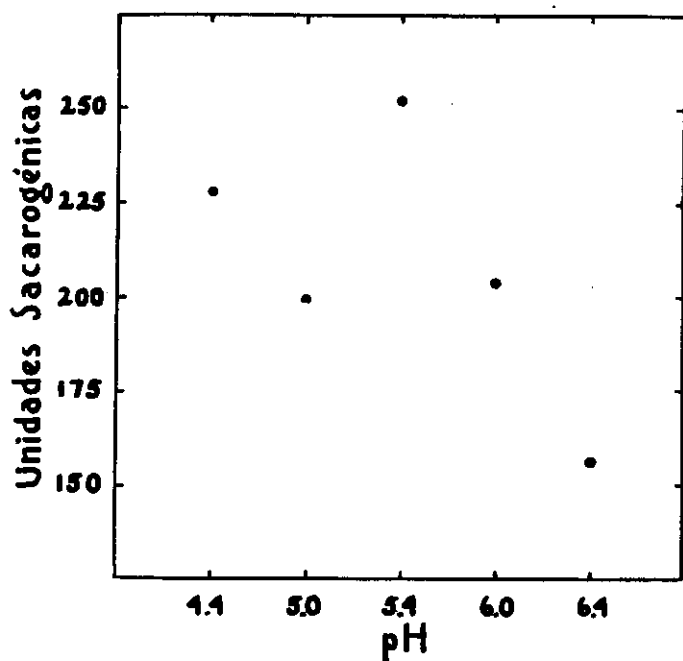
En primer lugar se procedió a determinar el pH óptimo para la extracción de amilasas de semillas germinadas.

Como quiera que podría haber diferencias apreciables en el mismo proceso de extracción, se escogieron 6 lotes de frijol negro germinado por 6 días en las mismas condiciones y con ellos se prepararon los extractos de 24 horas, como se dijo antes, y a distinto pH, obteniendo los resultados que aparecen en la gráfica No. 1.

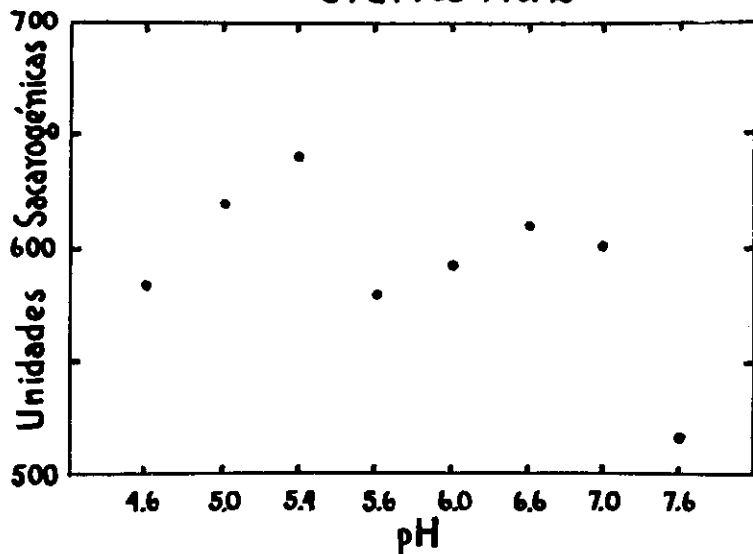
De la misma se deduce que el pH óptimo de extracción de la enzima es de 5.4.

En consecuencia se estudió el pH óptimo de acción de los extractos de frijol germinado, preparados con soluciones buffer de acetatos a pH 5.4. Para ello se partió de un extracto de 14 días y se tomó del mismo un ml. en cada experimento, haciéndolo actuar por una hora en presencia de soluciones buffer a distinto pH, todo ello de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente. Los resultados obtenidos se expresan en la gráfica No. 2.

Gráfica No. 1



Gráfica No. 2

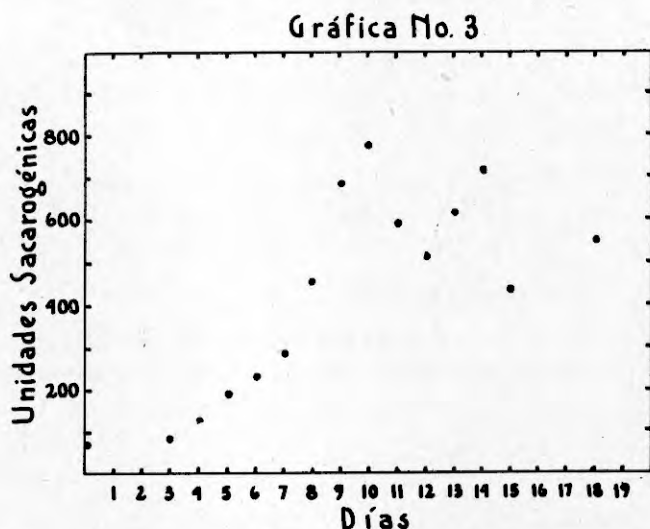


De lo anterior se deduce que el pH óptimo de acción de la enzima estudiada es el mismo de la extracción, esto es, de 5.4, y por lo tanto en todos los experimentos que se describen posteriormente sobre la actividad sacarogénica en el proceso de germinación, se omite este dato, ya que siempre se han preparado los extractos con buffers de acetatos a pH 5.4.

Actividad sacarogénica en el proceso de germinación

Procedimos a estudiar la actividad sacarogénica del frijol germinado, preparando numerosos lotes que pesaron alrededor de 5 gr. y se hicieron germinar en las condiciones señaladas anteriormente. Las experiencias comprenden de los 3 a los 18 días de germinación.

Los resultados aparecen en la gráfica No. 3.



En la gráfica anterior se observa que la máxima actividad tiene lugar a los 10 días. Se observa además en los primeros días un aumento sensiblemente uniforme en la actividad enzimática, en tanto que después del décimo día hasta el décimo octavo aparecen varias irregularidades, especialmente en los días 13 y 18.

Ahora bien, se sabe que distintas causas pueden modificar sensiblemente la actividad amilásica: el agua, temperatura, variedad de semillas y época de recolección, tienen marcada influencia en la actividad enzimática.

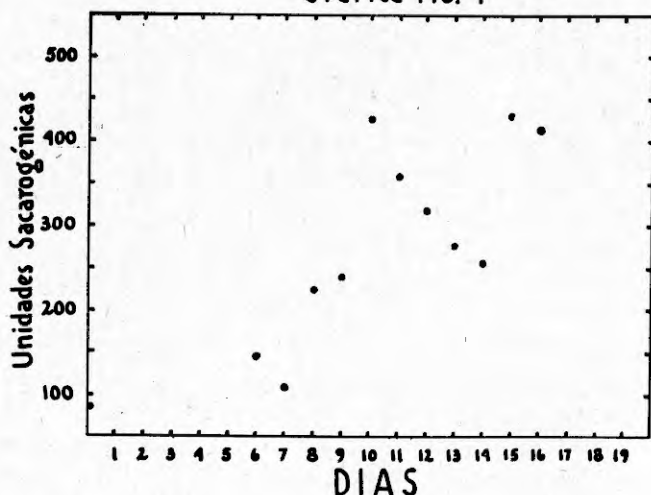
Para demostrar que la actividad sacarogénica presenta sensibles diferencias entre distintas variedades de frijol, tomamos muestras de 3 variedades: negro, palacio y chilar, y una vez preparados los extractos correspondientes se valoró su acción enzimática. Los resultados se expresan en la tabla No. 1.

Tabla No. I

Variedad de Frijol	U. S.
Negro	72
Palacio	92
Chilar	74

El frijol palacio es el que tiene más actividad; le sigue el chilar, y ocupa el último lugar la variedad de frijol negro. Señalaremos que el tamaño y peso de las semillas están en relación con la actividad sacarogénica.

Gráfica No. 4



Hemos estudiado, además, la influencia que puede tener la oscuridad en el desarrollo de las semillas y consiguientemente en la actividad amilásica.

Los resultados de las experiencias hechas con semillas germinadas en la oscuridad y en las mismas condiciones que las anteriores, se expresan en la gráfica No. 4, advirtiéndose que sólo se prepararon extractos con lotes de los días 6 al 16 del proceso de germinación, porque antes del sexto día el desarrollo de las semillas era insignificante, y después del día 16 los frijoles perdían sus caracteres normales.

Las semillas colocadas desde un principio en ausencia de luz, germinaron lentamente y no alcanzaron un desarrollo normal en comparación con los frijoles que recibieron la luz solar.

La actividad máxima aparece también a los 10 días, pero es casi un 50% menor que la observada en la gráfica No. 2. Antes de los 10 días no se observa el ascenso gradual de la actividad sacarogénica, después desciende gradualmente hasta el día 14, asciende bruscamente al día siguiente, para descender nuevamente en el último experimento.

Para mayor claridad hemos considerado conveniente incluir un cuadro comparativo de la actividad sacarogénica en el frijol germinado en presencia y ausencia de luz, expresando los respectivos resultados en unidades sacarogénicas y en grados Lintner.

TABLA No. II

DIAS	UNIDADES SACAROGENICAS		GRADOS LINTNER	
	LUZ	OBSCURIDAD	LUZ	OBSCURIDAD
3	84		630	
4	124		930	
5	196		1470	
6	228	146	1710	1095
7	280	136	2100	1020
8	452	224	3390	1680
9	680	240	5100	1700
10	772	424	5790	3190
11	592	356	4440	2670
12	508	316	3810	2370
13	608	276	4560	2070
14	712	252	5340	1890
15	428	432	3210	3330
16	—	412	—	3090
18	548	—	4110	—

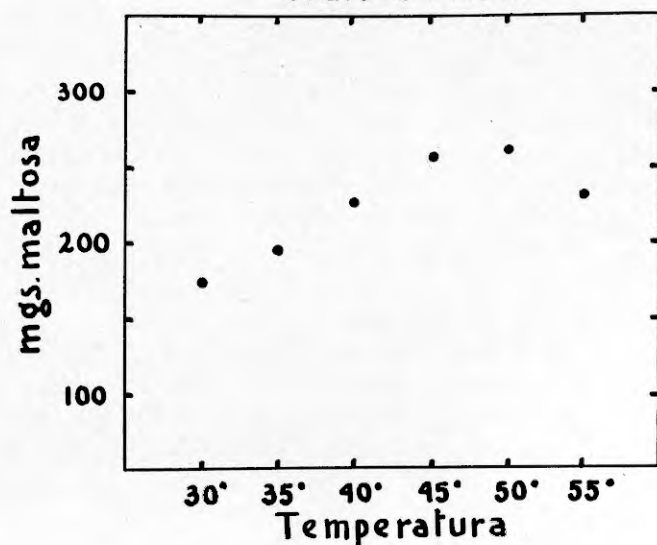
Para aclarar un punto que consideramos interesante, estudiamos la actividad amilásica relativa en cotiledones y embriones; se acepta que las amilasas se forman en el embrión y con más exactitud en la capa epitelial del mismo, pero no puede negarse que el endospermo tiene también actividad enzimática, aunque disminuída en comparación con la anterior. Se partió de semillas germinadas por 7 días; se separaron embriones y cotiledones, se desecaron por 24 horas a 45°, y una vez pulverizados se prepararon los extractos de acuerdo con la técnica descrita anteriormente.

Tabla No. III

Cotiledones	400 U.S.
Embriones	1204 U.S.

En la Tabla No. 3 aparece confirmada la suposición anterior, esto es, que la actividad sacarogénica en los embriones es 3 veces mayor que en los cotiledones, pero de todos modos hay en estos últimos una pequeña actividad digna de tomarse en cuenta.

Gráfica No. 5



Influencia de la temperatura

Se estudió la actividad amilásica en función de la temperatura, utilizando para ello extractos de frijoles germinados por 10 días. Debe advertirse que en este caso, la actividad enzimática sobre el sustrato almidón duró, en cada experiencia, 15 minutos a la temperatura de 30 a 55°. Los resultados obtenidos se expresan en la gráfica No. 5, en la que se observa que la mayor actividad sacarogénica está entre 45 y 50°.

Discusión:

De los experimentos anteriores se deduce que la actividad sacarogénica de la semilla aumenta a medida que avanza el proceso de germinación, lo que ha dado motivo para que se formulen varias hipótesis que tratan de explicar estos hechos.

Swanson³³ considera que las amilasas existen en la semillas de trigo al estado de proamilasas, las que son activadas por el agua durante la germinación. Waldsmitd-Leitz³⁵ supusieron la existencia de una amiloquinasa en los extractos de cebada germinada. Myrbach^{23, 24} atribuye el aumento de actividad de la beta amilasa a la acción de una proteasa que libera a dicha enzima de su primitiva combinación con material proteínico, transformándola en amilasa activa. Chrzaszcz y Janiki^{7, 8} suponen que se forman en la germinación ciertas eleutosustancias que nulifican el efecto inhibitor que las sistosustancias tienen normalmente sobre la amilasa. Lüers²¹ afirma que el aumento en la actividad se debe a síntesis enzimática que se acelera a medida que avanza el proceso de germinación, y probablemente se acelera más por la acción de amiloquinasa.

Nosotros hemos visto que en el laboratorio la amilasa necesita ser liberada por la papaína, esto es, por una proteasa, como lo pusieron de manifiesto Ford y Guthrie¹⁰ en 1908. En estas condiciones aumenta la actividad sacarogénica, lo que puede explicar el aumento progresivo de la acción amilásica en los primeros días de germinación, por acción de las propias proteasas del vegetal. Como la enzima estudiada es de naturaleza proteínica, es lógico suponer que empieza su síntesis en los primeros días y se acelera la misma a medida que avanza el desarrollo del vegetal, hasta el momento en que ya no depende de las enzimas que tenía de reserva, sino que trabaja exclusivamente con las que elabora.

Según Hopkins,¹⁸ el medio óptimo de acción de la enzima sacarificante de los cereales es a pH 4.5. Nosotros hemos encontrado 5.4, y aunque es verdad que no hemos trabajado con beta amilasa pura, se desprende del trabajo que la acción sacarificante se debe principalmente a esa enzima. Por otra parte, está demostrado que es muy difícil eliminar la alfa amilasa, y con esto se comprenderá por qué la acción sacarificante que hemos estudiado la atribuimos fundamentalmente a la beta, sin excluir la posible acción de la alfa amilasa.

Además, podemos poner de manifiesto que la luz tiene una marcada influencia en la actividad sacarogénica de las semillas germinadas, ya que las que crecieron en la oscuridad tuvieron acción mucho menor.

Los posibles medios por los cuales la luz puede influir o modificar la actividad sacarogénica y posiblemente otras actividades enzimáticas, son difíciles de dilucidar.

Como hacemos notar en la parte que se refiere a los experimentos con frijoles germinados en la oscuridad, se observa un desarrollo muy lento de la planta y además muy débil, lo que resulta lógico, ya que al no recibir luz, la planta no puede sintetizar nuevas sustancias y por lo tanto no puede tener una vida propiamente autotrofa, sino que vive heterotróficamente a expensas de sus reservas de los cotiledones. En cambio una planta expuesta a la luz, no solo crece a partir de sus reservas, sino que también puede sintetizar nuevas sustancias. Es obvio que en ausencia de luz la planta no sólo crecerá de modo más lento, sino que, además, tendrá desarrollo inferior al normal y al mismo tiempo menor actividad enzimática. En este caso la influencia de la luz será indirecta.

PROTEASAS

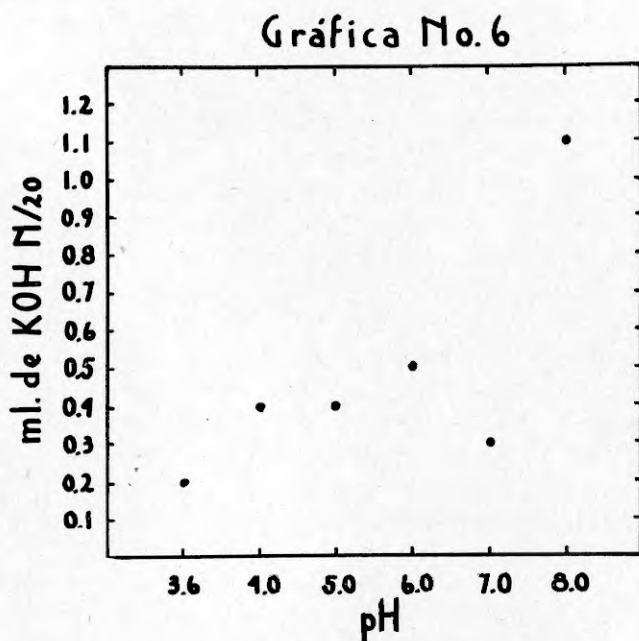
Hemos estudiado además la acción de proteasas en las semillas de frijol negro durante el proceso de germinación. Demostramos primero su presencia en el frijol seco utilizando el procedimiento de Waldschmidt-Leitz descrito por Llamas.²²

Los extractos enzimáticos se obtuvieron añadiendo 5 volúmenes de agua a un peso de semilla pulverizada y desengrasada; después de agitación conveniente se dejó en reposo en el refrigerador por 24 horas, se centrifugó y, descartado el sedimento, se trató el

líquido con acetona hasta precipitación completa, se centrifugó de nuevo, y el precipitado, libre de acetona, se disolvió en agua casi completamente, de tal modo que 1 ml. de la solución acuosa equivale a 2 gr. de frijol.

Acción óptima en función del pH

Para estudiar esa acción se utilizaron buffers de acetatos y fosfatos. Los resultados se expresan en la gráfica No. 6.



De lo anterior se deduce que la actividad óptima de las proteasas del frijol estudiado fué de pH 8.0.

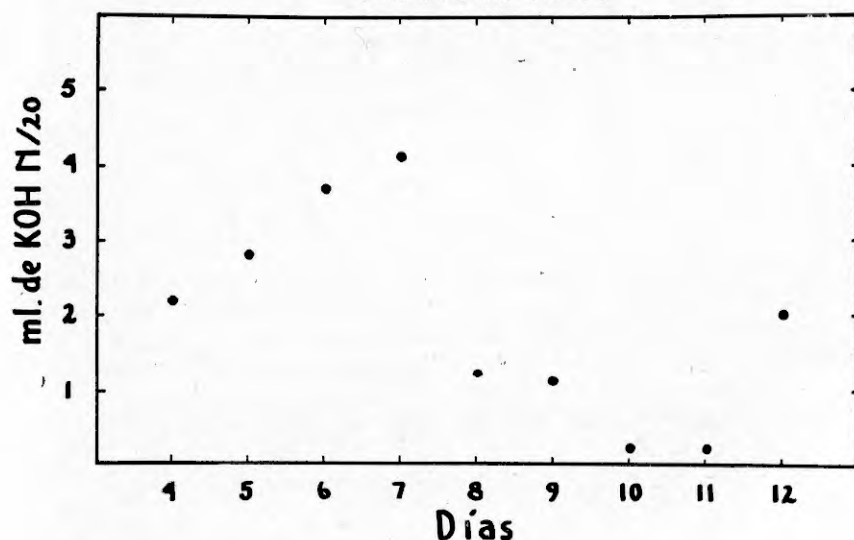
Proteasas en el proceso de germinación

La acción de proteasas en el proceso de germinación, se estudió primero con extractos de frijoles germinados por varios días y desmenuzados después hasta pasta homogénea y posterior desecación a

40°. De acuerdo con el trabajo de J. Labarre y S. Pfeffer,¹⁹ teníamos la seguridad de que, en esas condiciones y guardando el polvo en refrigerador por unos días, no se destruiría la actividad enzimática. Desgraciadamente no fué así, ya que 6 extractos que preparamos con polvo desecado resultaron inactivos, esto es, gastaron de KOH N/20 alcohólica la misma cantidad que los testigos, esto es, sin enzima.

En consecuencia se procedió a preparar extractos enzimáticos con frijoles germinados sin desecación previa, preparando numerosos lotes con 5 gr. de frijoles que germinaron en las mismas condiciones señaladas en la primera parte de este trabajo. Para la acción proteolítica se utilizó 1 ml. de extracto obtenido con 90% de buffer de fosfatos de pH. 8, y 0.2 gr. de NaCl. En todos los casos se dejó en maceración por 24 horas; centrifugación posterior para separar la parte insoluble, continuando después como se dijo antes. A la vez se repitió cada experimento con sustrato en blanco para obtener por diferencia la actividad real. Los resultados obtenidos se expresan en la gráfica No. 7.

Gráfica No.7



La actividad proteolítica estudiada alcanza su acción más intensa a los 7 días, desciende bruscamente al día siguiente, y así se mantiene con ligero ascenso al duodécimo día.

El frijol contiene cantidad relativamente grande de prótidos, alrededor de 24%: es indudable que esas reservas han de ser aprovechadas por acción adecuada de proteasas, satisfaciendo las necesidades propias del vegetal antes de que aparezca la acción sintética, como se demuestra claramente por los resultados obtenidos en nuestros experimentos. Después de unos días en que ya se aprovecharon los prótidos de reserva, empieza la actividad normal de la planta y, como es natural, ha de predominar la acción sintética.

CONCLUSIONES

Se ha estudiado la actividad sacarogénica y proteolítica del frijol negro en el proceso de la germinación.

1a. El pH óptimo de acción de la enzima sacarogénica estudiada es de 5.4.

2a. La actividad sacarogénica, durante el proceso de germinación, aumenta progresivamente hasta el décimo día; después desciende en forma irregular.

3a. La misma actividad, estudiada en ausencia de luz solar, resultó ser alrededor de un 50% menor.

4a. La temperatura óptima de acción es de 45 a 50°.

5a. El pH óptimo de actividad proteolítica es de 8.0.

6a. La máxima actividad de las proteasas en el proceso de germinación corresponde al séptimo día.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BACH, A., OPARIN, A. and WAHNER, R., 1927.— Untersuchungen über den Fermentgehalt von reifenden, ruhenden und keimenden Weizensamen. *Biochem. Z.* 180: 363-370. (Tomado de *Plant Physiology*. Miller: 828.)
- 2.—BALLS, A. K. and HALE, W. S., 1938.—The preparation and properties of wheat proteinase. *Cereal Chem.* XV: 622.
- 3.—BARTON, A. W., 1920.—The lipolytic activity of the castor and soy bean. *J. Am. Chem. Soc.* 42: 620-632.
- 4.—BLISH, M. J. and SANDSTEDT, R. M., 1933.—An improved method for the estimation of flour diastatic value. *Cereal Chem.* X: 189.

- 5.—, and KNEEN, E., 1938.—The Cereal amylases with reference to flour and malt behavior. *Cereal Chem.* XV: 629.
- 6.—CLEVELAND, F. C. and KERR, R. W., 1948.—The action of Beta amylase on corn amylase. *Cereal Chem.* Vol. XXV: 133.
- 7.—CHRSZASZCZ and JANIŁ, 1933.—Eleuto amylase, eine antisistoamylasesubstanz. *Biochem. Z.* 263: 250-261.
- 8.—, 1936.—Amylase during the growth and ripening of grains. *Biochem. J.* 30: 1298-1302.
- 9.—DAWSON MARTIN, V. and MARSHALL NEWTON, J., 1938.—Comparative rates of amylase action on starches. *Cereal Chem.* XV: 456.
- 10.—FORD, J. S. and GUTHRIE, J. M., 1908.—Contribution to the biochemistry of barley. Part. 1. The amylase of resting barley. *J. Inst. Brew.* 14:61. (Tomado de *Chem. Abs.* 2: 1593.)
- 11.—HILLS, C. H. and BAILEY, C. H., 1938.—The nature of the increase in amylase activity of germinating barley. *Cereal Chem.* XV: 273.
- 12.—, 1938.—The amylases of different barley varieties. *Cereal Chem.* XV: 351.
- 13.—HOPKINS R. H., 1946.—Actions of the amylases. *Advances in Enzymology*. Vol. VI: 389-414.
- 14.—KNEEN, E. and SANDSTEDT, R. M., 1941.—Beta amylase activity and its determination in germinated and ungerminated cereals. *Cereal Chem.* XVIII: 237.
- 15.—, MILLER, B. S. and SANDSTEDT, R. M., 1942.—The influence of the temperature on the development of the amylase in wheat germinated. *Cereal Chem.* XIX: 11-25.
- 16.—, SANDSTEDT, R. M. and HOLLENBECK, C. M., 1943.—The differential stability of the malt amylases separation of the alpha and beta components. *Cereal Chem.* XX: 399.
- 17.—, 1944.—A comparative study of the development of amylases in germinating cereals. *Cereal Chem.* XXI: 304.
- 18.—, and HADS, H. L. 1945.—Effects of variety and Environment on the amylases of germinated wheat and barley. *Cereal Chem.* XXII: 407.
- 19.—LABARRE, J. et PFEFFER, S., 1946.—Etudes sur les enzymes de la fève gourgane (*Vicia faba* L.) pendant la germination. *Revue Canadienne de Biologie*. V, No. 2: 233.
- 20.—LINTNER, C. J., 1886.—Amylases of Wheat. *J. Pra. Kt. Chem.*, 34, 378. (Tomado de Geddes W. F. *Advances in Enzymology*. VI: 415-468.)
- 21.—LUERS, H., 1936.—Changes in enzymes during malting. *Cereal Chem.* 13: 153-171.
- 22.—LLAMAS, R., 1947.—Actividad proteolítica del tejido tiroideo sobre gelatina como substrato. *An. Inst. Biol.* XVIII, No. 1: 17.
- 23.—MYRBACK, K. and MYRBACK, S., 1933.—Über gersten und Malzamyase. *Biochem. Z.* 258: 158-171.

- 24.———, 1936.—Über freie und gebunden amylase in der Gerste. *Biochem. Z.* 285: 282-289.
- 25.—MARTIN, V. D., NAYLOR, N. M. and HIXON, R. M., 1939.—Action of beta amylase from soy beans on various starches. *Cereal Chem.* XVI: 565.
- 26.—NEWTON, J. M., FARLEY, F. F. and NAYLOR, N. M., 1940.—The use of soy bean beta amylase to follow the modification of starch. *Cereal Chem.* XVII: 342.
- 27.———, HIXON, R. M. and NAYLOR, N. M., 1943.—Soy bean amylase. II. Further purification of crude soy bean. Beta amylase concentrates. *Cereal Chem.* XX: 23.
- 28.—SANDSTEDT, R. M. and BECKARD, O. C., 1946.—Photomicrographic studies of wheat starch. II. Amylolytic enzymes and the amylase inhibitor of the developing wheat kernel. *Cereal Chem.* XXIII: 548.
- 29.—SNIDER, S. R., 1941.—The determination of total beta amylase in barley and barley malt. *Cereal Chem.* XVIII: 186.
- 30.—STAMBERG, O. E. and BAILEY, C. H. 1939.—Effect of adding alpha and beta amylases to doughs. *Cereal Chem.* XVI: 42.
- 31.———, 1939.—Studies on wheat starch. II. The action of amylases on raw wheat starches. *Cereal Chem.* XVI: 319.
- 32.———, 1939.—Studies on wheat starch. III. The action of amylases on wheat amylopectin and amylose. *Cereal Chem.* XVI: 330.
- 33.—SWANSON, C. O. and CALVIN, J. W., 1913.—A preliminary study of the conditions which affect the activity of the amylolytic enzymes in wheat flour. *J. Am. Soc.* 35: 1635-1640.
- 34.—TASCHER, W. R. and DUNGAN, G. H. 1928.—Seedling vigor and diastatic activity of dent corn as related to composition of endosperm and stage of maturity. *J. Am. Soc. Agron.* 20: 133-141.
- 35.—WALDSHMIDT-LEITZ, E., 1931.—En purr A. *Z. physiol. Chem.* 203, 117. (Tomado de Geddes, W. F., 1946, Amylases of Wheat. *Advances in Enzymology.* VI: 415-468.)