

“Caracterización de α -glucosidasa y β -amilasa obtenidas a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.”

Fernandez Bauer, Martina^a; Filippa Mauricio Andres^a

a: Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis
e-mail: mauricio.filippa@gmail.com

Resumen

Las levaduras desarrollan procesos de fermentación en alimentos, producto de su actividad enzimática. La separación y posterior caracterización de estas proteínas, permiten que las mismas sean utilizadas en procesos biotecnológicos. En nuestro caso, se extrajo α -glucosidasa y β -amilasa a partir de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidas como producto final de la elaboración de cerveza artesanal. Con el objetivo de que estas enzimas sean utilizadas como pretratamiento para la obtención de alimentos para uso animal, se estudió la variación de la actividad de estas enzimas en diferentes condiciones operativas. Para ello se realizó la extracción de las enzimas mediante un mecanismo ya descrito previamente, obteniéndose un concentrado acuoso que se conserva a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su uso posterior. En la determinación de la actividad de α -glucosidasa se utiliza un método espectrofotométrico donde los azúcares reductores, reaccionan con el ácido 3,5 dinitrosalicílico. Utilizando el mismo método para β -amilasa, se siguió su actividad mediante la adición del ion triyoduro. Para ambas enzimas se calculó la actividad y se estudió como esta es modificada por las condiciones de temperatura y pH del medio. En los resultados, la máxima actividad de la enzima α -glucosidasa se observó a los $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en un rango de pH de entre 6,5-7,0; para la β -amilasa se observó su máxima actividad a los $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a un pH de entre 5,5-6,5. Podemos concluir que las actividades de las enzimas son auspiciosas a fin de aplicar las mismas es procesos de pretratamiento de alimentos con destino animales monogástrico o rumiantes.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, β -amilasa, α -glucosidasa, caracterización.

INTRODUCCIÓN

Saccharomyces cerevisiae es una levadura que constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad; su nombre deriva del vocablo Saccharo (azúcar), myces (hongo) y cerevisiae (cerveza). Es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa. Puede aislarse con facilidad en plantas, en la tierra, como así también del tracto gastrointestinal y genital humano.

Esta levadura es utilizada en el proceso de producción de etanol y a su vez constituye una valiosa fuente de proteínas y vitaminas para la alimentación animal. Además, es utilizada en la formulación de alimentos para aves y cerdos, empleándose la levadura de recuperación de la fermentación alcohólica, por ser un componente rico en proteínas. Por otro lado, la levadura inactivada por temperatura se usa como fuente de nutrimentos en alimentación animal y humana, tanto en forma de levadura íntegra como a partir de sus derivados.

La separación y posterior caracterización de proteínas provenientes de distintas fuentes, permiten que las

mismas sean utilizadas en procesos biotecnológicos. En nuestro caso, se extrajo α -glucosidasa y β -amilasa obtenidas como producto final de la elaboración de cerveza artesanal.

Las enzimas son biocatalizadores que, cuando están presentes en una reacción química, aumentan la velocidad de la reacción sin afectar las propiedades ni la naturaleza del producto final. Casi todas las enzimas son proteínas, pero no todas las proteínas son enzimas. Las enzimas son muy específicas en su acción, por lo que cada enzima cataliza sólo un tipo de reacción. La actividad de las enzimas puede verse influenciada por un cambio de pH, la temperatura y la concentración del sustrato presente.

La enzima β -amilasa es una amilasa que se encarga de generar unidades de maltosa (2 glucosas) desde la terminación de una cadena lineal de la estructura del almidón, creando así una molécula libre, de maltosa cada vez. Las β -amilasas en la naturaleza presentan rangos de temperatura óptimo de trabajo que van desde los $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a los $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ o más, por lo que es muy importante determinar este rango de temperatura óptima para la obtención de productos.

Por otro lado, la enzima α -glucosidasa actúa sobre el almidón hidrolizando moléculas más simples, para finalmente obtener glucosa como producto.

OBJETIVOS

Este trabajo se realizó con el objetivo de caracterizar estas enzimas extraídas a partir de *Saccharomyces cerevisiae* en diferentes condiciones operativas, como ser pH y temperatura de trabajo, para que sean utilizadas como pretratamiento en procesos de obtención alimentos con destino a animales monogástrico o rumiante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de la Enzima

Para realizar la extracción de la enzima se utilizó el método informado por P. Wesche-Ebeling y col. [1]. Como materia prima se utilizó levaduras activas que realizaron procesos de fermentación, mezclándose con la solución extractora en una proporción 1:1. El producto obtenido luego se somete a centrifugación en frío ($\approx 5^\circ\text{C}$) a 15000 rpm por espacio de 15 minutos. Producto del proceso antes descrito se obtiene un sobrenadante líquido untuoso, que contiene la enzima. El líquido, se coloca en tubos individuales con cierre hermético y se almacena en el freezer (-18°C) para su conservación y posterior uso.

Determinación de la Actividad Enzimática

La evaluación de la actividad de los extractos de las enzimas β -amilasas y α -glucosidasas se realizó de forma separada. Para el seguimiento de la reacción, se utilizó una técnica espectrofotométrica partiendo de la adición en el medio de reacción de reactivos específicos.

La observación de la reacción de la α -glucosidasa, se realizó mediante la formación de un compuesto coloreado, cuando los azúcares reductores formados como producto de la actividad enzimática reaccionan con el ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), acompañado de un medio acuoso que posee hidróxido de sodio (NaOH), fenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$) y sulfito de sodio (Na_2SO_3) en proporciones adecuadas.

En el caso de la enzima β -amilasa se sigue la reacción mediante la adición de solución de iones triyoduro (I^{-3}) que forman complejos color azulado con el almidón.

La actividad enzimática se definió como la diferencia de Absorbancias de las muestras que poseen las enzimas con respecto a un blanco que no la posee por la unidad de tiempo (minutos).

Perfil térmico de actividad

Para obtener el perfil térmico de la enzima β -amilasa se colocaron en baños termostáticos con temperaturas de 25, 30, 35, 40 y 45 $^\circ\text{C}$, erlenmeyers que contenían 30 mL de solución buffer a pH 6,5, 3 mL de un concentrado de almidón soluble y 2,5 mL de extracto de las enzimas. Para cada ensayo a las diferentes temperaturas, se tomaron alícuotas de esta solución a distintos tiempos y se adicionaron cantidades necesarias del indicador I^{-3} hasta observar el cambio de color, para luego realizar la medición espectrofotométrica a 640 nm.

Para determinar el perfil térmico de las enzimas α -glucosidasas se colocaron en baños termostáticos con temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 y 50 $^\circ\text{C}$, erlenmeyers que contenían 30 mL de solución buffer a pH 6,5, 1,5 mL de almidón y 2,5 mL de extracto de las enzimas. Para cada ensayo a las diferentes temperaturas, se tomaron alícuotas a distintos tiempos de esta solución y se agregaron cantidad suficiente del indicador DNS, para luego realizar la medición espectrofotométrica a 570 nm.

Parámetros Termodinámicos. Ecuación de Arrhenius

Del análisis de los valores de las actividades halladas en la cada una de las condiciones de reacción versus las temperaturas (ver gráficos 1 y 2) se observa el ln de las actividades de β -amilasas y α -glucosidasas vs. la inversa de la temperatura en unidades absolutas. Conociendo la ecuación de Arrhenius a partir de la ordenada al origen y la pendiente fue posible obtener la Energía de activación y el factor de frecuencia para ambas reacciones.

$$\ln k = -\frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln A$$

pH Óptimo

Para obtener el pH óptimo de la enzima β -amilasa se colocaron en baños termostáticos a 35 $^\circ\text{C}$, erlenmeyers que contenían 30 mL de soluciones buffer de distinto pH en un rango que va de 3,0 a 9,0; 3 mL de almidón y 2,5 mL de enzima. Posteriormente se tomaron alícuotas

de esta solución a distintos tiempos y se adicionaron cantidades necesarias del indicador I³ para luego realizar la medición espectrofotométrica a 640 nm. Para determinar el pH óptimo de α -glucosidasa, se colocó en baños termostáticos a 40 °C, erlenmeyers que contenían 30 mL de soluciones buffer a distintos pH en un rango que va de 2,0 a 9,5, 1,5 mL de almidón y 2,5 mL de enzima. Después se tomaron alícuotas de la solución a distintos tiempos y se agregó la cantidad suficiente del indicador DNS para luego realizar la medición espectrofotométrica a 570 nm. Del análisis de los valores de las actividades halladas en la cada una de las condiciones de reacción versus las temperaturas (ver gráficos 3 y 4) se puede observar la actividad de β -amilasa y α -glucosidasa en estas condiciones.

RESULTADOS

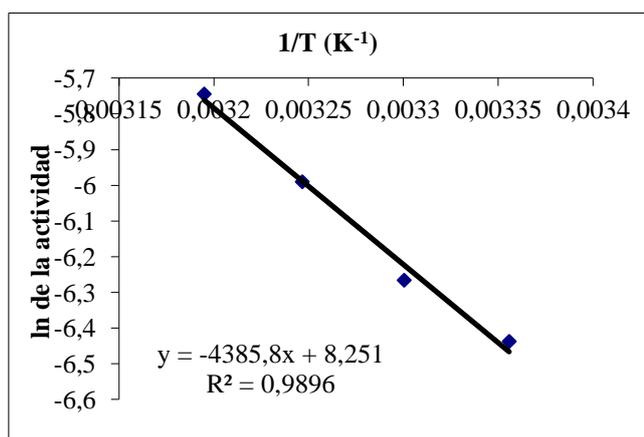


Gráfico 1: Influencia de la temperatura en la actividad de β -amilasa

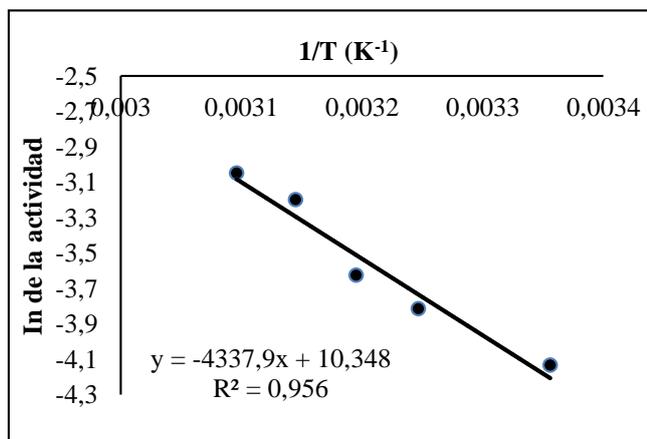


Gráfico 2: Influencia de la temperatura en la actividad de α -glucosidasa

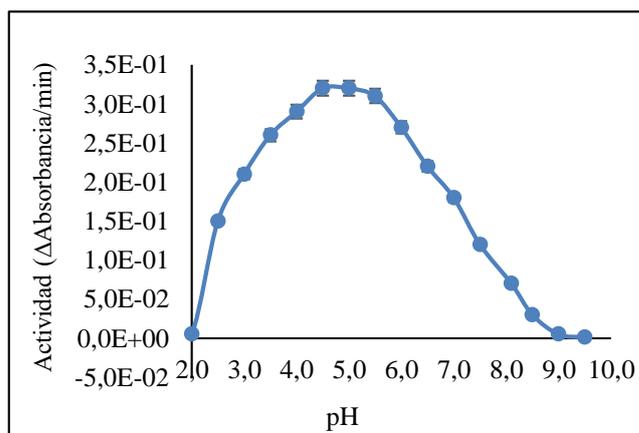


Gráfico 3: Influencia del pH en la actividad enzimática de β -amilasa

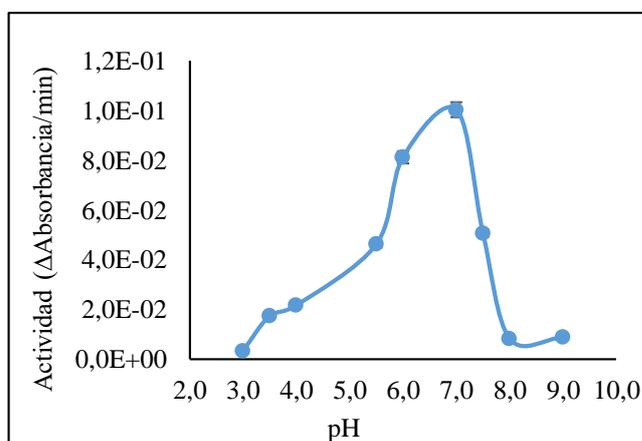


Gráfico 4: Influencia del pH en la actividad enzimática de α -glucosidasa

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se pudieron determinar parámetros termodinámicos de la cinética para ambas enzimas que luego junto a los parámetros de estabilidad permitirán obtener otras variables de importancia. Para ambas enzimas se pudieron determinar sus perfiles de pH observándose áreas de máxima actividad. Resulta de importancia hallar estas enzimas y caracterizarlas, con el fin de que, a partir de estas variables, sea posible definir condiciones de trabajos en procesos biotecnológicos.

BIBLIOGRAFÍA

[1] P. Wesche-Ebeling, M.W. Montgomery, J. Food Sci. 55 (1990) 1320-1325