

## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE TRES ISOAMILASAS DEL BARRENADOR MENOR DE LOS GRANOS (*Rhizopertha dominica* F.)

Fernando I. Díaz-Malvárez<sup>a,\*</sup>, Francisco J. Cinco-Moroyoqui<sup>b</sup>, Carlos Regalado-González<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro. C.U. Cerro de las Campanas s/n, Querétaro, Qro. México, A.P. 184, C.P. 76010. E-mail: [dmfer@correoa.uson.mx](mailto:dmfer@correoa.uson.mx)

<sup>b</sup>Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro, Hermosillo, Sonora.

Palabras clave: Isoamilasas *R. dominica*, hidrólisis de almidón, purificación de proteínas.

**Introducción.** Los granos de cereales son susceptibles al ataque de diversas plagas. *Rhizopertha dominica* es la plaga de insectos de granos de almacén más importante a nivel mundial (1). Para abatir las pérdidas de los granos almacenados y mantener su calidad alimentaria, es necesario comprender el mecanismo de acción que el insecto tiene para utilizar el sustrato.

**Metodología.** Se emplearon 3 poblaciones de insectos cultivadas en trigo tetraploide *Triticum aestivum* var. Júpate, bajo condiciones controladas. Los extractos amilolíticos se obtuvieron mediante la técnica de Baker (2). El extracto crudo se trató con sulfato de amonio de 25-75% de saturación, y ésta fracción se resolvió mediante cromatografía de interacción hidrofóbica en fenil sefarosa CL-4B, eluyendo la proteína con un gradiente lineal de etilén glicol (0-50%) y un gradiente lineal negativo de sulfato de amonio (25-0%). Se realizaron pruebas bioquímicas de caracterización y se determinaron las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$ .

**Resultados y discusión.** Se aislaron tres isoamilasas de *Rhizopertha dominica* denominadas IA-0.70, IA-0.79 y IA-0.90, de acuerdo a su movilidad relativa en PAGE. Las IA-0.70 y IA-0.79 mostraron un pH óptimo de 7.0, mientras que para la IA-0.90 fue de 6.5. Las tres IA presentaron estabilidad a 50°C por 1 hora, pero a 60°C se perdió el 50% de actividad a los 20 minutos de incubación y se inactivaron a una hora. El  $\beta$ -mercaptoetanol en concentraciones superiores a 30 mM incrementó 2.5 veces más la actividad amilolítica de las tres isoamilasas empleando almidón de trigo como sustrato. El patrón de acción de las tres isoenzimas fue el típico de las endoamilasas, sin embargo se observaron diferencias en la eficiencia hidrolítica medida bajo el coeficiente  $V_{max}/K_m$  en almidón, amilopectina y amilosa. La acción hidrolítica de la IA-0.90 en almidón y amilopectina ( $V_{max}/K_m=75.0$  y  $56.3$ , respectivamente) fue menos eficiente que en amilosa ( $V_{max}/K_m=240.2$ ). La IA-0.70 hidroliza al almidón y a la amilosa en rangos similares ( $V_{max}/K_m=203$  en promedio), pero en amilopectina no fue tan eficiente ( $V_{max}/K_m=123.6$ ) la suma de resultados sugiere que las IA-0.70 y IA-0.79 pertenecen a un grupo de isoamilasas sacarificantes que

hidrolizan fragmentos de oligosacáridos provenientes de la acción hidrolítica de la IA-0.90. La acción simultánea de las tres isoamilasas en almidón podría facilitar al insecto a reproducirse y alimentarse de los granos de trigo durante el almacenamiento

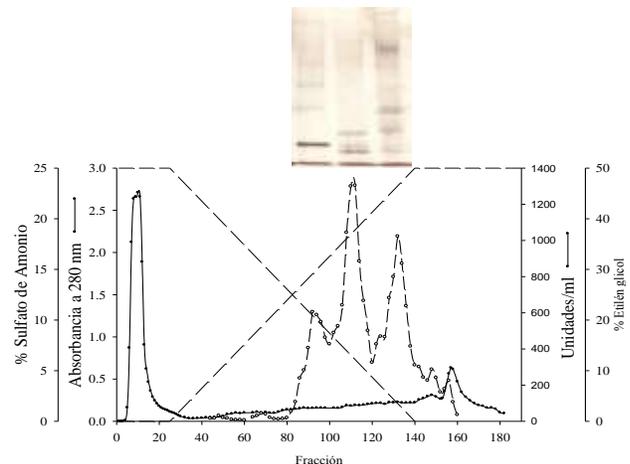


Fig. 1. Cromatografía en fenil sefarosa CL-4B de un extracto amilolítico de *Rhizopertha dominica*. Arriba, SDS-PAGE (10%) no reductora en tinción con plata.

**Conclusiones.** El factor de purificación fue de 32.3 para las IA en conjunto (datos no mostrados) y la actividad amilásica recuperada fue del 45%, por lo que la cromatografía de interacción hidrofóbica en fenil sefarosa demostró ser una buena herramienta para purificar isoamilasas de *R. dominica* en dos etapas.

**Agradecimiento.** Se agradece el soporte financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

### Bibliografía.

- Longstaff, C.B. (1999). An experimental and modelling study of the demographic performance of *Rhizopertha dominica* (F.) and development rate. *J. Stored Prod. Res.* 35: 89-98.
- Baker J.E. (1991). Purification and partial characterization of  $\alpha$ -amylase allozymes of the lesser grain borer, *Rhizopertha dominica*. *Insect Biochem.* 21(3): 303-311.