

Purificación Parcial y Caracterización de Alfa Amilasa de granos germinados de *Chenopodium quinoa* (Quinoa)

Partial Purification and Characterization of Alpha Amylase from germinated grains from *Chenopodium quinoa* (Quinoa)

Melissa Bedón Gómez, Oscar Nolasco Cárdenas, Carlos Santa Cruz Carpio y Ana Gutiérrez Román

Universidad Nacional Federico Villarreal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática
Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Jr. Río Chepén S/N, El Agustino. Telefax: 362 - 3388

Resumen

Las alfa amilasas son las enzimas más estudiadas e importantes en el campo biotecnológico e industrial; ya que han reemplazado por completo la hidrólisis química del almidón. Estas enzimas son imprescindibles en la elaboración de productos alimenticios, combustibles, medicamentos y detergentes con la finalidad de optimizar procesos y conservar el medio ambiente. La α -amilasa puede ser purificada de diferentes organismos como plantas, animales, hongos y bacterias; actualmente un gran número de α -amilasas bacterianas en especial del género *Bacillus* están disponibles comercialmente y son las más utilizadas en las industrias. Sin embargo, la producción de éstas no satisfacen los requerimientos industriales en el mundo; ya que, la demanda de esta enzima se ha incrementado en los últimos dos años y el empleo de α -amilasas bacterianas ha provocado alergias afectando al 15% de la población a nivel mundial. . En este estudio, como fuente de α -amilasa se emplearon semillas de *Chenopodium quinoa* (*quinua*) var hualhuas blanca durante el proceso de germinación; esta enzima fue parcialmente purificada por precipitación con sulfato de amonio obteniendo una actividad específica final de 35.60U/mg y un grado de purificación de 5 veces. La purificación fue confirmada por SDS-PAGE, encontrando un peso molecular de 44kDa. La actividad enzimática se evaluó mediante el método de Miller mostrando máxima actividad a pH 7 y a temperatura de 37°C. La linealización de Lineweaver-Burk nos dio un Km de 16mg/mL y Vmax de 100 μ M de maltosa/min. Por lo tanto, esta caracterización reúne los pre-requisitos necesarios para la aplicación en la industria.

Descriptor: *Chenopodium quinoa*; alfa amilasa; germinación; purificación parcial.

Abstract

The alpha amylases are the enzymes most studied and important in biotechnology and industry; because they have completely replaced the starch's chemical hydrolysis. These enzymes are essential in the food production, medicines and detergents in order to optimize processes and conserve the environment. The α -amylase can be isolated from different organisms such as plants, animals, fungi and bacteria, now a large number of bacterial α -amylases especially from genus *Bacillus* are commercially available and they are the most used in industry. However, the production of these do not meet industry requirements in the world, because the demand for this enzyme has increased in the last two years and the use of bacterial α -amylase has caused allergies affecting the 15% of the global population. In this study, as a source of α -amylase used the seeds from *Chenopodium quinoa* (quinoa). Var. white hualhuas during the germination process, this enzyme was partially purified by ammonium sulfate precipitation to obtain a final specific activity of 35.60U/mg, and a grade of purification of 5 times. The purification was confirmed by SDS-PAGE, where the molecular weight was 44kDa. The enzyme activity was evaluated by Miller method showing maximum activity at pH 7 and 37°C. The Lineweaver-Burk linearization shows a Km of 16mg/mL and Vmax of 100 μ M the maltose / min. Therefore, these characterization meet the prerequisites need for industry.

Keywords: *Chenopodium quinoa*; alpha amylase; germination; partial purification

Introducción

La quinua (*Chenopodium quinoa*) es un pseudocereal nativo de América del sur y actualmente el Perú es considerado uno de los países con mayor producción; especialmente en los departamentos de Puno, Cuzco, Ayacucho, Apurímac, Huancavelica y Junín y se presume que la tasa de producción para el año 2013 se incrementará el 15% hasta llegar al 48,000 TN, [1]. Desde el punto de vista nutricional la quinua posee un excepcional equilibrio de proteínas, grasa, aceite y almidón, así como un alto grado de aminoácidos esenciales, [2]. El almidón es el mayor componente de las semillas de quinua y comprende aproximadamente el 55% de su peso, [3]. Este carbohidrato es la principal fuente de energía e importante para el desarrollo y crecimiento de la planta; ya que, cuando las semillas inician el proceso de germinación, el almidón comienza a degradarse por acción de las α amilasas; con la finalidad de proporcionar las moléculas de glucosa que serán oxidadas para producir la energía necesaria para el desarrollo del embrión, [4].

Las α -amilasas son las enzimas más estudiadas e importantes en el campo biotecnológico e industrial; ya que han reemplazado por completo la hidrólisis química del almidón (Polisacárido más explotado a nivel mundial), [5]. Esta enzima es imprescindible en la elaboración de productos alimenticios, combustibles, medicamentos y detergentes con la finalidad de optimizar procesos y conservar el medio ambiente. En la industria alimentaria, la α -amilasa es ampliamente empleada en la elaboración de pasteles, preparación de digestivos, jarabes, cerveza y panadería, [6]; esta industria invierte anualmente millones de euros en la elaboración de productos libres de sustancias químicas altamente contaminantes, ya que esto podría ocasionar problemas de eutrofización, ecotoxicidad y efectos sobre la salud humana, [7].

La α -amilasa puede ser purificada de diferentes organismos como plantas, animales, hongos y bacterias; actualmente un gran número de α -amilasas bacterianas están disponibles comercialmente y son las más utilizadas en las industrias, debido a que son considerados más estables a altas temperaturas, [5]. Sin embargo, la producción de estas enzimas no satisfacen los requerimientos industriales y de salud en el mundo; Además, la utilización de α -amilasas bacterianas en la industria alimentaria ha provocado sensibilidad (alergias) en la población, como es el caso del "asma del panadero". Por lo tanto, la creciente demanda de

esta enzima en el campo industrial ha establecido un hecho que evidencia la necesidad de buscar nuevas alternativas de α -amilasa con una eficiente actividad y que no provoquen efectos negativos sobre la salud humana.

En el presente estudio, el objetivo principal fue purificar parcialmente y caracterizar la alfa amilasa de granos germinados de *Chenopodium quinoa* (quinua) var. hualhuas blanca, con la finalidad de demostrar que la α -amilasa de quinua presenta características cinéticas similares a los cereales. Para cumplir con dicho objetivo, se determinó el tiempo de germinación de las semillas donde la actividad de la α -amilasa es mayor, el peso molecular estimado, la afinidad de la α -amilasa por el almidón soluble y la temperatura y el pH óptimo de la α -amilasa.

Materiales y Métodos

Muestra Biológica

Se emplearon semillas de *Chenopodium quinoa* (quinua) var. hualhuas blanca provenientes de la ciudad de Huancayo-departamento de Junín, que fueron seleccionados según el tamaño del grano (mayores a 1,6 mm de diámetro), se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% durante 5 minutos y posteriormente fueron lavados hasta retirarlo completamente, quedando estos listos para su germinación.

Determinación del tiempo de germinación

Para determinar el tiempo de germinación donde la actividad de la α -amilasa de quinua es mayor; se utilizaron placas petri con solución de estreptomycin y gentamicina, (5 μ g/ μ l cada uno). El tiempo de incubación de cada muestra fue variable (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 48 y 72 horas) y se realizó en una cámara oscura, a una temperatura de 22°C y 83% de humedad relativa. Las semillas previamente germinadas fueron recolectadas y homogenizadas (extracto crudo), en cada extracto se determinó la cantidad de proteínas totales y la actividad enzimática de la α -amilasa. Por otro lado, se evaluó el porcentaje de germinación y almidón a cada tiempo de germinación.

Preparación del extracto crudo

El método que se tuvo en cuenta para la preparación del extracto crudo fue según, [8] en la cual, las semillas previamente germinadas fueron trituradas con Buffer fosfato 20mM con 6.7mM de cloruro de sodio a pH, 6.9 atemperado a 4°C en relación de (1w:5V). El filtrado obtenido se centrifugó a 2000 g

durante 20 minutos, descartando el precipitado. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 4500 g durante 5 minutos recuperando el sobrenadante. Se utilizó centrifuga refrigerada a 4°C.

Extracción y purificación parcial de la enzima

Previamente determinado el tiempo de germinación, se colocaron a germinar semillas en las mismas condiciones y el extracto crudo u homogenizado con buffer fosfato (1w:3v) fueron ajustados a 45% de saturación con sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄. La precipitación proteica se realizó durante 15 horas a 4°C. Posteriormente el precipitado y el sobrenadante fueron desalinizados y concentrados mediante tubos con filtros Amicon Ultra 10K-NMWL de 10 000. El sobrenadante obtenido se dejó precipitando con sulfato de amonio a 60% de saturación durante 15 horas a 4°C. La separación del precipitado, la desalinización y la concentración se realizó siguiendo el mismo procedimiento ya descritos anteriormente.

Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

El protocolo de electroforesis utilizado fue el establecido por Laemmli en 1970. La electroforesis se realizó con la finalidad de determinar el peso molecular estimado de la α -amilasa de *Chenopodium quinoa* (quinua). El sistema de electroforesis empleado fue de geles de dos fases, la fase de apilación o de stacking fue de 4.5 % de gel poliacrilamida y la fase de resolución al 12% de poliacrilamida. Se utilizó un equipo de electroforesis vertical.

Cuantificación de proteínas totales

En cada una de las muestras y fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de α -amilasa, se determinó la concentración de proteínas utilizando el método de Gornall en 1947 y un espectrofotómetro Shimatzu 1700.

Evaluación de actividad enzimática

Los germinados fueron cosechados para la extracción de enzima que usa 0.02 M NaH₂PO₄, en pH 6.9, con 0.006 m NaCl y el extracto fue usado en el ensayo. El método utilizado para evaluar la actividad enzimática de la α -amilasa fue el método de Miller (DNS), cuyo protocolo fue el establecido por sigma – Aldrich, donde el almidón primero fue convertido a maltosa catalizado por la alfa-amilasa. Luego a la maltosa se le hace reaccionar con el ácido 3, 5-dinitrosalicílico, formando un producto coloreado con máxima absorción en 540 nm, cuando esta reducido. Los valores de la absorción fueron leídos sobre una curva estándar establecida con el aumento de las cantidades de maltosa. La concentración de proteína total fue determinada por

método de biuret y la actividad expresada en unidades por mg proteína. Una unidad de actividad de alfa-amilasa es definida como μ m de maltosa producido por minuto y la actividad específica fue expresado en términos de unidades por mg de proteína.

Caracterización Cinética de la α -amilasa

Para su respectiva caracterización se evaluó el efecto de temperatura y pH sobre la velocidad de reacción y los parámetros cinéticos de la amilasa fueron determinados a pH 7 y a 37°C. Los valores de la constante de Michaelis (Km) y la velocidad máxima fueron determinados mediante la linealización de Lineweaver-Burk. Equipos utilizados: fueron un baño maría graduable de temperatura y un espectrofotómetro.

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias significativas y las correlaciones entre los valores obtenidos o variables se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y la prueba de correlación de Tau Kendall mediante el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

Resultados y Discusión

Determinación del tiempo de germinación vs. La Máxima Actividad enzimática.

En la figura 1 se muestra los valores actividad amilásica del extracto crudo de las semillas germinadas de *Chenopodium quinoa* a diferentes tiempos (0-72 horas). Se puede apreciar que las semillas germinadas de 36 horas son las que presentan mayor valor de actividad específica (24.345U/mg) y el menor valor fue obtenido a las 0 Horas de germinación (8.953U/mg). (Figura 1). (P=0.025*). *: La actividad enzimática se incrementa significativamente a las 36 horas de germinación con 95% de confiabilidad. De cada uno de los tiempos de germinación evaluados se colocaron 100 μ g de proteínas en cada posillo de un gel de SDS-PAGE al 12%, en esta imagen se aprecia que la enzima α -amilasa cuyo peso molecular estimado fue de 44 kDa presenta una progresiva aparición en las primeras horas de germinación (0-36 horas) y un descenso en las últimas horas (42-72 horas).

Nuestros resultados concuerdan con el estudio de otros autores en otros cereales, como arroz, soja, donde la actividad específica de la enzima aumentó a un máximo después de la inbibición y después disminuyó, [9].

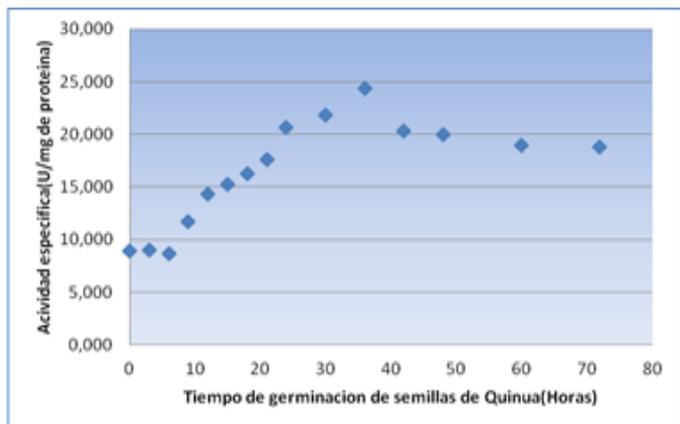


Figura 1. Actividad específica del extracto crudo de semillas de *Chenopodium quinoa* var. *hualhuas* blanca germinadas a diferentes horas.

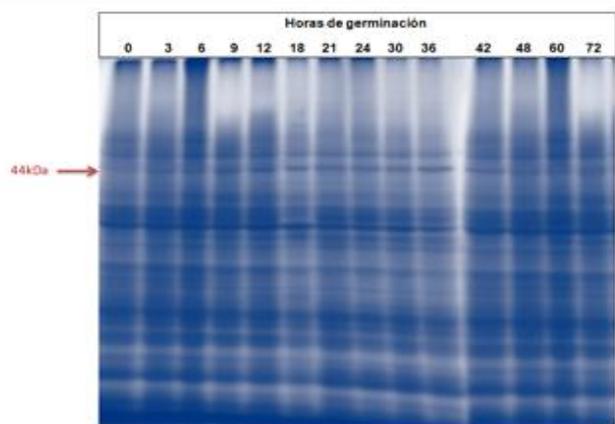


Figura 2. Corrida electroforética SDS-PAGE-12 % de los extractos crudos de las semillas de *Chenopodium quinoa* var. *hualhuas* blanca germinadas a diferentes horas.

Evaluación del grado de purificación y rendimiento (%) de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de la α -amilasa

La tabla 1 muestra el rendimiento de proteínas y el grado de purificación de las fracciones obtenidas durante el proceso; en la cual, se determinó que la fracción precipitado 2 (P2) presenta mayor actividad específica (35,60U/mg) con un grado de purificación de 5.0 veces y rendimiento de proteínas de 30 %. Además la fracción de menor actividad específica es el sobrenadante 2 (S2) con 5.38U/mg. La actividad específica de la fracción P2 muestra una diferencia significativa respecto al extracto crudo. ($P < 0.01$) con el 99% de confiabilidad según la prueba de Kruskal - Wallis. Nuestro resultado se asemeja a los resultados obtenidos por Machaiah y Espinel donde, su mejor rendimiento de purificación de la α -amilasa lo obtuvieron en el rango de 45 y 70% de saturación respectivamente, [8] y [10]. Además, tenemos datos que indican que en la germinación de soja donde usaron el fraccionamiento con sulfato de amonio dio

la purificación de 6.7 veces, [11], lo cual posiblemente ayudó a eliminar a los inhibidores de las amilasas alfa, [12].

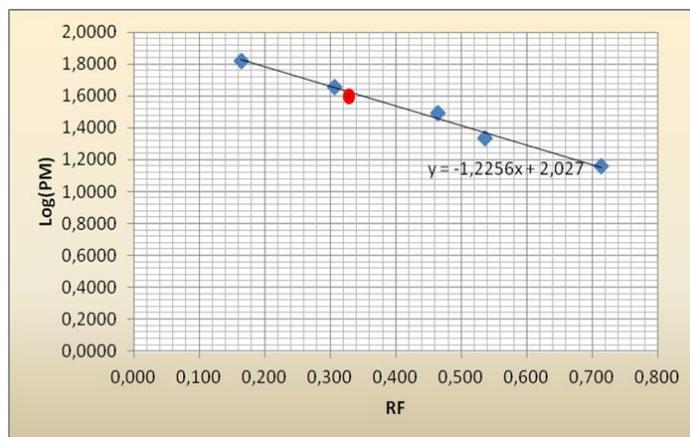
Tabla 1. Resumen de la purificación de α -amilasa de semillas germinadas de *Chenopodium quinoa* var. *hualhuas* blanca.

Fracciones	Volumen total (mL)	Proteína (mg)	Actividad enzimática U (μ mol/ml)	Rendimiento (%)	Actividad específica (U/mg)	Grado de Purificación
Extracto Crudo	20	191,9	32,0	100	6,69	1,0
Precipitado 1 (*45%)	10	18,7	25,3	28,1	27,15	4,06
Sobrenadante 1 (*45%)	20	68,8	23,2	70,4	13,50	2,02
Sobrenadante 2 (*60%)	8	28,1	9,4	40,5	5,38	0,80
Precipitado 2 (*60%*)	12	14,7	21,8	30,1	35,60	5,32

*Porcentaje de saturación con sulfato de amonio

Determinación del peso molecular de la α -amilasa

La comparación de la movilidad electroforética de la α -amilasa de *Chenopodium quinoa* var. *hualhuas* blanca con la de los marcadores de peso molecular conocidos permitió establecer un peso molecular de 44 kDa (Rf: 0.313) tal como se muestra en la figura 3 y 4. Tomando en cuenta los estudios de Warner, esta enzima correspondería a una de las diferentes formas de amilasas que se encuentran en granos germinados de cereales y que sus pesos moleculares están alrededor de 42 a 45 kDa, [13]. Además, la α -amilasa de quinua presenta un peso molecular similar a la de *Oriza sativa* (arroz) (40 kDa) obtenido por Ziegler [14] y la de *Triticum* sp. (43 kDa) [8].



[Figura 3. Representación gráfica de la extrapolación entre el Rf y el Logaritmo del peso molecular de proteínas estándar y el valor de Rf de *Chenopodium quinoa* var. *hualhuas* blanca.

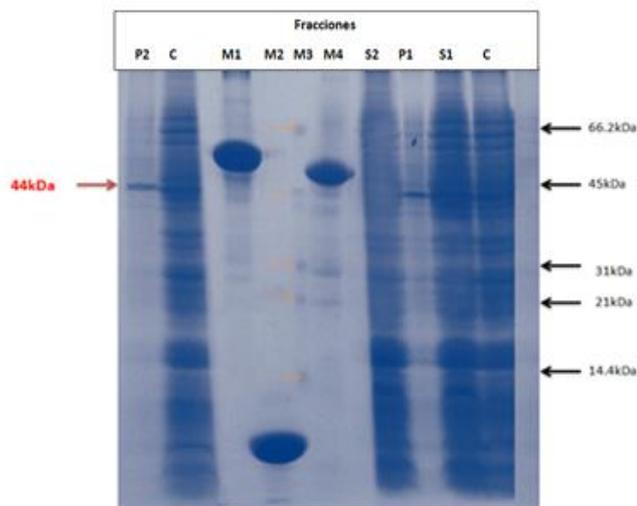


Figura 4. Corrida electroforética SDS-PAGE-12 % de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de la enzima α -amilasa de *Chenopodium quinoa* var. hualhuas blanca. En Carril P2: Precipitado 2 (60%), Carril C: extracto crudo, carril M1: BSA, carril M2: Lizosima, carril M3: marcador Biorad, carril M4: α -amilasa de *Bacillus licheniformis*. Carril S2: Sobrenadante 2, Carril P1: Precipitado 1 (45%), Carril S1: Sobrenadante 1.

Caracterización Cinética de la α -amilasa

Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción de la enzima Determinación de la velocidad máxima (Vmax) y Km.

Según la representación de Lineweaver-Burk (fig.5), se pudo determinar los valores de Km y Vmax. Donde $-1/Km = -0.06$ y $1/Vmax = 0.01$. Por lo tanto: la velocidad máxima de la reacción es $100 \mu M/min$ y la concentración de sustrato donde la enzima funciona a la mitad de la velocidad máxima (Km) es $16 mg/mL$. La α -amilasa de *Chenopodium quinoa* var. hualhuas blanca posee 75%, 56.3% y 50% de afinidad por el almidón soluble, comparada con las α -amilasas de granos como: *Zea maiz* (maíz) ($Km = 12.5 mg/mL$), de *Panicum miliaceum* (mijo) ($Km = 9 mg/mL$) y *Triticum sp* (trigo) ($Km = 8 mg/mL$), [15] Su afinidad es mucho menor si la comparamos frente a las α -amilasas microbianas como *Bacillus sp*, *Aspergillus fumigatus* y *Thermofibida pullulans* cuyos valores de Km son relativamente bajos (1.64; 0.42 y 0.88 mg/mL respectivamente), [16].

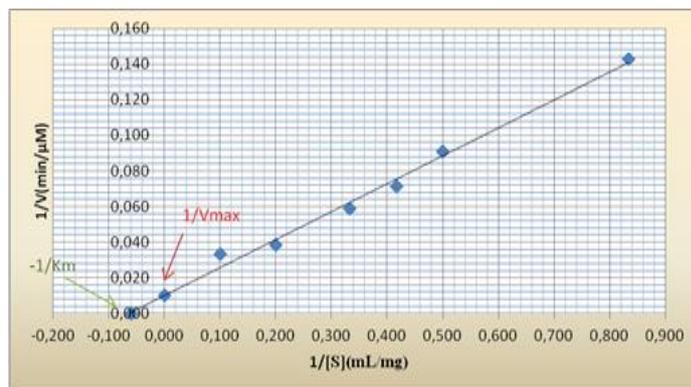


Figura 5. Representación de Lineweaver-Burk: Inversos de las velocidades enzimáticas de la α -amilasa de *Chenopodium quinoa* var. Hualhuas blanca frente a los inversos de las concentraciones de sustrato.

Efecto de pH y temperatura sobre la velocidad de reacción.

En la figura 6 se aprecia que la máxima actividad enzimática de la α -amilasa de *Chenopodium quinoa* var. hualhuas blanca se obtuvo a pH neutro (pH: 7) cuya velocidad de reacción es $20 \mu M/min$ y la mínima velocidad se obtuvo a pH ácido cuya velocidad registrada es $4 \mu M/min$. Dicha enzima presenta actividad máxima en el rango de pH: 5.6-7. Este dato concuerda con lo obtenido por Saleh, quien reportó que el pH óptimo de la α -amilasa de *Triticum aestivum* (trigo) se encuentra en el rango de 5.0 a 7.0, [17]. Sin embargo, se observa que la actividad enzimática es muy baja a pH ácido: pH 3.8. El pH óptimo para las α -amilasas de cereales y microorganismos es variable, pero se encuentra generalmente en el rango 6-0-7.0. Existen pocos reportes de esta enzima con un pH óptimo por debajo de 5.0. Algunos casos excepcionales incluyen la alfa amilasa producida por *Alicyclobacillus acidocaldarius* con un pH óptimo de 3.0 y la producida por *Pyrococcus furiosus* activa a un pH de 3.5, [18].

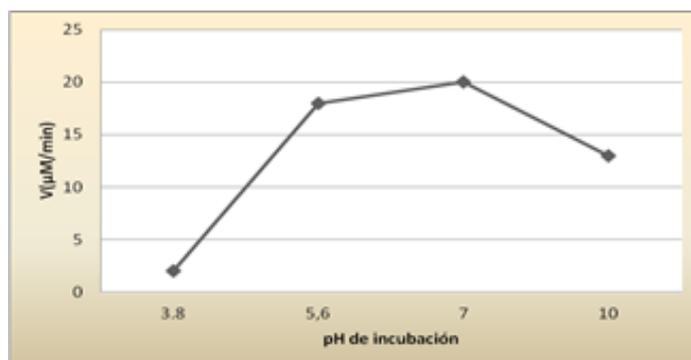


Figura 6. Efecto del pH sobre la velocidad de reacción de α -amilasa de *Chenopodium quinoa* var. hualhuas blanca.

En la figura 7, se aprecia que la máxima actividad enzimática se obtuvo a 37°C cuya velocidad de reacción es 17µM/min. Además se puede apreciar que sigue manteniendo estabilidad a 4°C y 100°C (11 y 7 µM/min respectivamente). La temperatura óptima de la α-amilasa de *Chenopodium quinoa* var. hualhuas blanca (37°C) es la misma de *Oriza sativa* (arroz) y *Pachyrhizus erosus* (yacón) que fueron reportados por Abe y Noman, [19]. Sin embargo, las α-amilasas de otros cereales como de *Triticum* sp. (Trigo) presentan mayor estabilidad y el rango de la temperatura óptima es de 40-50°C. Comparando con la de microorganismos, la mayoría de α-amilasas producidas por bacterias del género *Bacillus* presentan una temperatura óptima cercana a los 70 y 100 °C [18].

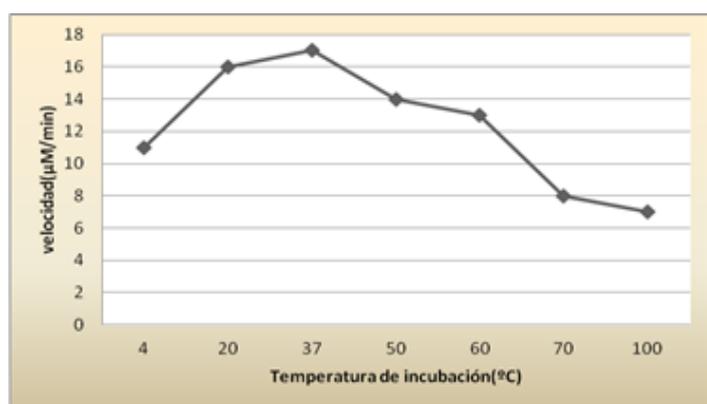


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de α-amilasa de *Chenopodium quinoa* var. hualhuas blanca.

Conclusiones

1. El tiempo de germinación de las semillas de *Chenopodium quinoa* (quinua) var. hualhuas blanca donde la α-amilasa tiene mayor actividad enzimática es de 36 horas y presenta un peso molecular estimado de 44 kDa.
2. La enzima α-amilasa de *Chenopodium quinoa* (quinua) var. hualhuas blanca presenta una baja afinidad por el almidón soluble (Km: 16mg/mL) y llega a su máxima actividad a 37°C y pH: 7 que es similar a la de los cereales.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial a los integrantes del laboratorio de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad Federico Villarreal por su apoyo en el desarrollo del proyecto y a la institución por brindarnos sus instalaciones.

Referencias

- [1] Portal agrario del MINAG (Ministerio de agricultura del Perú) (2013).
- [2] Food and Agriculture organization of the United Nations (FAO). La quinua cultivo milenario para contribuir a la seguridad mundial. Oficina Regional para América latina y el caribe: Informe técnico N° 37(2011). p 1-7.
- [3] D. Lindeboom. Studies on the characterization, biosynthesis and isolation of starch and protein from Quinoa (*Chenopodium quinoa wild*). Department of Applied Microbiology and Food Science, University of Saskatchewan. Canadá (2005).
- [4] E. Coon, A. Stumpf y R. doi. Bioquímica fundamental.ediciones Limusa (2da edición). Mexico (2001). p 736.
- [5] P. Monteiro de souza and P. De Oliveira. Application of Microbial α-Amylase in industry. Brazilian journal of microbiology (2010). p.850-861.
- [6] A. Guadarrama, J. Orosco y M. Morales. Obtención de alfa amilasa a partir de *Aspergillus Orizae*. Universidad Autonoma. Mexico (2009).
- [7] J. Martinez. Utilización de α-amilasas en la formulación de detergentes industriales. Departamento de ingeniería Química (Facultad de ciencias). España (2005)
- [8] J. Machaiah and U. Vakil. Isolation and partial characterization of α-amylase components evolved during early wheat germination. bhabha atomic research center vol 6 (1984).
- [9] A. Ismail, G. Vergara & D. Mackill. Mechanisms associated with tolerance to flooding during germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*). Ann Bot. (2009) P 197–209.
- [10] E. Espinel y E. Lopez. Purificación y caracterización de α-amilasa de *penicillium commune* producida mediante fermentación en fase sólida. Vol 38 de revista colombiana de química. Colombia. (2009).
- [11] A. Kumari, V.Singh, J. Fitter. α-Amylase from germinating soybean (*Glycine max*) seeds – Purification, characterization and sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues. Phytochemistry, Volume 71 (2010). P 1657-1666.

- [12] A. Wisessing, A. Engkagul, A. Wongpiyasatid y K. Choowongkamon. Biochemical characterization of the alpha-amylase inhibitor in mungbeans and its application in inhibiting the growth of *Callosobruchus maculatus*. J. Agric. Food Chem. (2010) p 2131-2137.
- [13] D. Warner, M. Grove and C. Knutson. Isolation and characterization of α -amylases from endosperm of germinating maize. Cereal Chern. (1991). p 383-390
- [14] B. Ching Lee, B. Ho and H. Chou. Purification and characterization of the excreted α -amylase from germinating water spinach (*Ipomea aquatic forsk*) seeds. Department of biology, National Taiwan Normal University. Taiwan (2001). p 20-23.
- [15] O. Adewale and O. Okoronkwo. Comparative studies on α -amylases from malted maize (*zea mays*), finger millet (*eleusine coracana*) and sorghum (*sorghum bicolor*). Carbohydr polym. (2006). p 71-74.
- [16] Espinel E y Lopez E. Purificación y caracterización de α -amilasa de *penicillium commune* producida mediante fermentación en fase sólida. *Revista colombiana de química*. vol 38.(2009)
- [17] A.Saleh, M. Abdulrahman and L. Malki. Partial purification and characterization of five α -amylases from a wheat local variety during germination. Australian Journal of Basic & Applied Sciences. vol 3 (2009) p1740
- [18] M. Quintero, O. Montoya and P. Gutierrez. Purificación y Caracterización de una α -amilasa producida por la cepa nativa *bacillus* sp.bbm1. Grupo de biotecnología microbiana. Universidad nacional de colombia sede Medellín. Colombia (2009).
- [19] A. Maher, A. Maqtari, M. Khalid and S, Hazmy. Identification and characterization of α -amylase from yemeni bean (*dolichos lablab*) seeds. jordan journal of chemistry vol 6 n°2. (2010)

e-mail: melistart239@hotmail.com

e-mail: oscarnol@gmail.com

e-mail: anaisabelflor@gmail.com

e-mail: santacruzcm@yahoo.es