



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

DETERMINACION DE INHIBIDORES DE TRIPSINA
EN 13 SEMILLAS DE LEGUMINOSAS POR UN
METODO MICROELECTROFORETICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A :

MA. GUADALUPE AGUIRRE MARTINEZ

1980

M-21620



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

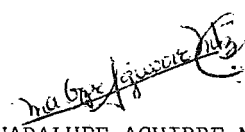
JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Prof. Ninfa Guerrero de Callejas
VOCAL	Prof. Enrique García Galeano
SECRETARIO	Prof. Angela Sotelo López
1er. SUPLENTE	Prof. Emilio Barragán Hernández
2o. SUPLENTE	Prof. Federico Galdeano Bienzobas

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

División de Estudios Superiores, Facultad de Química U.N.A.M.

SUSTENTANTE


MA. GUADALUPE AGUIRRE MARTINEZ

ASESOR


M. en C. ANGELA SOTELO

Con cariño, respeto y admiración
a mis padres:

Graciela y José

y que su esfuerzo por formarme
sea siempre un estímulo de supe-
ración en mi vida.

A mis hermanos:

Martha Graciela y José Othón

Para que nuestro principio de familia
y todas las cosas bellas que nos unen,
sean el aliciente que nos convierta en
hombres de provecho.

Con cariño a mis sobrinitos:

Martha Graciela y Ramón Amado

A mi tío: Arnulfo Martínez L.

Quiero hacer especial reconocimiento a:

La Maestra Angela Sotelo por su paciencia, estímulo constante y acertada dirección.

Al Q.F.B. Adolfo de la Vega por su ayuda técnica tan valiosa.

A mis abuelitos.

A mis tíos.

A mis amigos.

Agradzco a la ORGANIZACION DE
LOS ESTADOS AMERICANOS bajo
cuyo patrocinio se llevóa ca-
bo este trabajo.

C O N T E N I D O

	Pag
INTRODUCCION	1
I.- GENERALIDADES	4
Composición Química y Valor Nutritivo	5
Factores Tóxicos	8
Inhibidores de Proteasas	9
Inhibidores de Tripsina	15
Especificidad, Estequiometría y Reacción Cinética de los Inhibidores	21
Mecanismo de Interacción con Proteasas	23
Factores que afectan el contenido del Inhibidor de Tripsina	27
Electroforesis	29
II.- OBJETIVO	32
III.- PARTE EXPERIMENTAL	33
Materiales	33
Métodos	33
Determinación de Concentración de Proteína	33
Determinación de Inhibidores de Tripsina	35
Determinación de Inhibidores de Tripsina por Microelectroforesis	39
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION	52
V.- CONCLUSIONES	78
VI.- BIBLIOGRAFIA	79

INTRODUCCION

La definición de los seres vivos, al asentar que son: "entes que nacen, crecen, se reproducen y mueren" destaca el papel esencial que la nutrición juega en cualquier forma de vida.

Si el primero y el último elemento de la definición fijan un principio y un fin en cada organismo, destaca el carácter temporal de los entes biológicos y los ubica en el tiempo; el crecimiento y la reproducción, no son sino las manifestaciones estructurales que imprime a ellos, el esencial proceso de la constante incorporación de sustancias externas del medio ambiente que no es otro sino su nutrición.

En los organismos superiores se encuentran desarrolladas maravillosas estructuras y sistemas extraordinariamente complejos, que en proporción elevada están dedicados directa o indirectamente a proveer a cada una de las células que constituyen dicho organismo de los elementos adecuados para su correcta nutrición.

Basados en ciertas estadísticas (Abbott, 1966; Attschul, 1967) se puede estimar que a finales del siglo habrá aproximadamente seiscientos mil millones de habitantes sobre la faz de la tierra y que dos de estas partes usarán proteínas de origen vegetal y cuatro partes usarán proteínas de origen animal y será necesario mantener el

mismo nivel de nutrición que existe hasta ahora, que se sabe que no es óptimo en muchas partes del mundo.

Se ha considerado que las proteínas de origen vegetal alcanzarán gran importancia en las dietas del futuro. Aunque la producción de granos tales como el trigo, maíz y arroz pueden incrementarse para proveer una cantidad su ficiente del total de las proteínas necesarias, un factor importante en las proteínas de los cereales es su calidad pobre por su deficiencia en ciertos aminoácidos, especial mente lisina.

Por otro lado se han considerado a las leguminosas como unas de las principales candidatas para suministrar parte de las proteínas de origen vegetal que serán necesarias en el futuro. Este grupo de plantas presentan también inconvenientes, sus proteínas son limitantes en aminoácidos azufrados como metionina y cistina y además presentan ciertas sustancias tóxicas. (1)(28)

Por razones que la naturaleza tuvo a bien, dotó a ciertas plantas con la capacidad de sintetizar sustancias biologicamente activas, las cuales ejercen efectos dañinos en animales y en el hombre. En general se puede decir que hay dos categorías de esas sustancias. Aquellas cuyos efectos se han estudiado en una amplia variedad de animales, pero que sus efectos en el hombre permanecen hasta el momento desconocidos y aquellos que se sabe que producen reacciones adversas en el hombre pero que el factor

que causa esto es difícil de identificar porque la misma enfermedad es difícil y a menudo imposible de reproducir en animales.(2)

Aunque hay numerosos ejemplo de sustancias tóxicas en leguminosas, como los inhibidores de proteasas, hemaglutininas, etc. no obstante proporcionan una parte importante de las proteínas para el hombre en muchas partes del mundo. Esto se puede atribuir, en parte, al hecho de que el hombre ha aprendido a eliminar los tóxicos por procedimientos adecuados. La naturaleza variada de las dietas también ha disminuído la contribución de los tóxicos en la alimentación.

En contraste con el nivel bajo en proteínas que se encuentran en casi todos los cereales (6 - 14%), las semillas oleaginosas contienen 20 - 50 % de proteínas. Esto significa que el rendimiento de proteína por unidad de superficie es mucho mayor y ésta es una consideración muy importante donde la tierra cultivable es lo primero.

Por otro lado las proteínas de las semillas oleaginosas como la soya, el algodón y el cacahuate, o de otras leguminosas como el chícharo y frijoles, pueden combinarse con proteínas de cereales y producir una mezcla de proteínas de gran valor nutritivo.

GENERALIDADES

Las leguminosas constituyen un artículo alimenticio en todas partes del mundo. Sin embargo su uso esta particularmente ampliado en el trópico y subtrópico donde forman parte importante de la fuente de proteínas en la dieta habitual. En virtud de que son una fuente rica en proteínas entre los alimentos de origen vegetal, se consumen en mayor cantidad en lugares donde los alimentos de origen animal son caros y difíciles de surtir. Aunque hay 13,000 especies de la familia "leguminosae", las siguientes 18 especies de leguminosas son hoy en día ampliamente cultivadas para propósitos de consumo humano.

- 1.- *Archis hypogaea* (cacahuate)
- 2.- *Cajanus cajan* (gandul)
- 3.- *Cicer arietinum* (garbanzo)
- 4.- *Dolichos uniflorus*
- 5.- *Glycine max* (soya)
- 6.- *Lablab niger*
- 7.- *Lathyrus sativus*
- 8.- *Lens esculenta* (lenteja)
- 9.- *Parkia biglobosa*
- 10.- *Phaseolus lunatus* (frijol)
- 11.- *Phaseolus aureus* (frijol)
- 12.- *Phaseolus mungo* (frijol)
- 13.- *Phaseolus vulgaris* (frijol)

- 14.- Pisum sativum (chícharo)
- 15.- Pisum arvensa (chícharo de campo)
- 16.- Vicia faba (haba)
- 17.- Vigna unguiculata (cow pea)
- 18.- Voandzeia subterranea

De éstas, el cacahuete y la soya son cultivados principalmente por su contenido de aceite.

Ciertos tipos de leguminosas son especialmente cultivados y consumidos en algunas partes del mundo, variando la cantidad que se consumen de éstas, dependiendo de las condiciones de la agricultura, rurales o urbanas y de los niveles de ingresos. Parece ser que hay una relación inversa entre la disponibilidad de las leguminosas y los alimentos de origen animal. En diferentes ciudades de Asia como la India y Japón, el consumo de las leguminosas tiende a incrementarse con el incremento de ingresos, mientras que en otras ciudades como en Estados Unidos e Italia, se encuentra una tendencia opuesta. (3)

Composición química y valor nutritivo.

La composición química y el valor nutritivo de las leguminosas más usadas se ha determinado por muchos investigadores.

En general las leguminosas comestibles contienen entre 18 y 25% de proteína, con excepción del cacahuete y de la soya que tienen más. Se encuentran en general dos clases de proteínas: las globulinas y las albú

minas representan del 8 al 40% de las proteínas totales y el resto corresponde a las globulinas. Las globulinas son proteínas solubles en solución salina y han sido divididas en dos: legúminas y vicilinas. (4)

En general son una fuente pobre en grasas, con algunas excepciones, pero son ricas en ácidos grasos esenciales.

Las leguminosas fresacas también son fuente de tiamina, riboflavina, niacina, vitamina C y hierro, pero son relativamente pobres en calcio.

También se han encontrado en las semillas de leguminosas vitamina K y tocoferoles pero en pocas cantidades.

Contienen aproximadamente 60% de carbohidratos por lo que se les considera una buena fuente de energía.

La digestibilidad de las leguminosas varía dependiendo de la especie, pero también esta relacionada con dos factores: modo de preparación y características innatas de las semillas.

Por lo que se refiere a la preparación se ha observado que después de una hora de calentamiento la digestibilidad es de alrededor de 85%, pero si la cocción se hace por calentamiento a presión, puede aumentar hasta un 95%. Es importante también la cantidad que se consume, así como el estado en que se encuentra el tracto digestivo.

Las propiedades innatas relacionadas con la digesti-

bilidad pueden ser físicas o bioquímicas.

Las propiedades físicas incluyen el grado de molienda especialmente relacionadas con la adherencia de las gomas entre la cáscara y los cotiledones, las cuales determinan la firmeza con que se fijan la cáscara y el endospermo. (5)

Es bien sabido que el consumo de semillas leguminosas por el humano puede ocasionar un malestar gastrointestinal y flatulencia. Pueden aparecer náuceas, cólicos y diarrea en diferentes grados dependiendo de la leguminosa que se consumió. La identificación exacta de todos los factores que provocan la flatulencia no se ha hecho, sin embargo la presencia de refinosa y estaquiosa en la producción activa de gas sí se ha demostrado. El jugo digestivo de los mamíferos carece de α -galactosidasa, enzima que se requiere para hidrolizar esos oligosacáridos de bajo peso molecular. Los azúcares pasan a través del tracto gastrointestinal hacia el íleo y el colón donde hay mayor producción de hidrógeno, dióxido de carbono y gases de metano que tiene lugar por la microflora del intestino. Se ha demostrado que se forman principalmente 5 gases: nitrógeno, oxígeno, metano, hidrógeno y dióxido de carbono, los dos más importantes son el metano y el hidrógeno. (6)(7)

FACTORES TOXICOS

Como ya se mencionó, las leguminosas constituyen una fuente importante de proteínas para una gran parte de la población mundial, particularmente en aquellas ciudades donde el consumo de proteínas de origen animal esta limitado por la poca disponibilidad o por hábitos religiosos y culturales. Aunque las leguminosas tienen una relación muy importante en la dieta humana, al mismo tiempo se han considerado como tóxicas para el cuerpo animal. Estas sustancias pueden limitar su consumo y son las siguientes:

1).- Factores Termolábiles

- a).- Inhibidores de proteasas ✓
- b).- Hemaglutininas ✓
- c).- Componentes antivitaminicos y componentes que se unen a metales
- d).- Goitrogenéticos

2).- Factores estables al calor

- a).- Glucósidos cianogenéticos
- b).- Alcaloides

3).- Factores particularmente importantes que producen:

- a).- Latirismo
- b).- Favismo

De todos estos factores sólo se hablará aquí de los

inhibidores de proteasas que es el tema principal de este trabajo.

INHIBIDORES DE PROTEASAS

Son sustancias que tienen la habilidad de inhibir la actividad de ciertas enzimas. La inhibición de las enzimas se clasifica de modo amplio en dos tipos: irreversible y reversible. La inhibición irreversible implica, generalmente, la destrucción o modificación de uno o más grupos funcionales de la enzima.

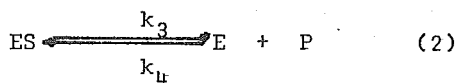
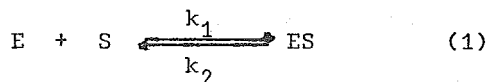
La inhibición reversible puede ser tratada cuantitativamente mediante el empleo de la relación de Michaelis-Menten.

Los principios generales de la cinética de las reacciones catalizadas enzimáticamente, se puede tratar del mismo modo que el de las reacciones químicas. Estas presentan características que no se observan en reacciones no enzimáticas como lo es el fenómeno de saturación por el sustrato.

A bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de la reacción, v , es proporcional a la concentración del sustrato, y la reacción es de primer orden. A medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad de reacción disminuye y ya no es proporcional a la concentración del sustrato, la reacción es de orden mixto. Si se aumenta la concentración del sustrato la velocidad se hace constante e independiente de la concentración

del sustrato. En este intervalo la reacción es de orden cero con respecto al sustrato, la enzima se encuentra saturada por el sustrato. En estas condiciones el factor limitante de la velocidad es la concentración de la enzima. Todas las enzimas presentan este efecto de saturación, pero varían con respecto a la concentración del sustrato que se necesita para dicha saturación.;

Este efecto de saturación llevó a L. Michaelis y M.L. Menten, a formular una teoría sobre la acción de las enzimas y de su cinética. Esta teoría dice que la enzima E, reacciona con el sustrato S, para formar el complejo enzima-sustrato ES, para después formar, en una segunda etapa, la enzima libre y el producto:



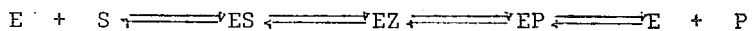
Ambas reacciones se considera que son reversibles; k_1 , k_2 , k_3 y k_4 son constantes de velocidad. La constante k_4 es habitualmente pequeña y despreciable en comparación con k_1 , k_2 y k_3 .

Después de una serie de deducciones matemáticas y consideraciones se llega a la siguiente expresión:

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_M$$

donde K_M es la constante de Michaelis Menten.

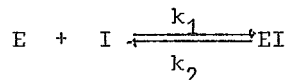
Debe mencionarse que muchas enzimas tienen un comportamiento cinético más complejo. Parece ser que en la mayoría de las reacciones catalizadas enzimáticamente intervienen dos o más complejos enzima-sustrato, que actúan así:



En la que EZ es el complejo del estado de transición y EP es un complejo enzima-producto.

Existen dos tipos principales de inhibición reversible: competitiva y no competitiva:

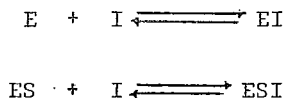
Inhibición competitiva.- El inhibidor competitivo I, reacciona con la enzima en el centro normal de unión del sustrato para formar de modo reversible un complejo EI:



El complejo EI no puede escindirse para formar productos de reacción del modo que lo hace el complejo ES. Esta inhibición se puede invertir aumentando la concentración del sustrato.

Inhibición no competitiva.- Este tipo de inhibición no se invierte por un aumento de concentración del sus-

trato. Tal vez el inhibidor se una a un lugar distinto que el de unión del sustrato; puede unirse a la enzima libre, al complejo ES o a ambos:

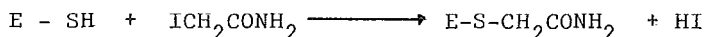


Las formas EI y ESI son inactivas.

El tipo más común de inhibición no competitiva es el que se observa con reactivos que pueden combinarse reversiblemente con los grupos -SH de los restos de cisteína.

En las reacciones donde el inhibidor reacciona irreversiblemente el tratamiento de Michaelis-Menten no resulta aplicable.

Un ejemplo de inhibición irreversible es el de los agentes alquilantes como la iodoacetamida, que puede reaccionar irreversiblemente con los grupos -SH esenciales:



La reacción rápidamente se va hacia la derecha, con formación de un derivado covalente de la enzima.

Otro inhibidor irreversible es el fluorofosfato de diisopropilo (DFP). Este inhibidor es un compuesto organofosforado tóxico, que se conoce también como veneno nervioso que inactiva a la colinesterasa, que participa en la función del sistema nervioso central. El DFP inhibe además otras enzimas que poseen un resto de serina activo,

esencial en su centro activo.(9)

Además de los inhibidores trípsicos, de los cuales se hablará con más detalle más adelante, existen otros inhibidores enzimáticos en algunas leguminosas que han sido poco estudiados.

Learmonth describió la inhibición de la actividad proteolítica de la papaína por extractos de soya.(10)

Seidl y Jaffé estudiaron la inhibición que ejerce una globulina de *Phaseolus vulgaris* sobre la pepsina, tripsina y papaína y otras proteinasas.(11)

Bowman (1945) describió un inhibidor de amilasa en frijoles.(13)

Kneen y Sundstedt (1946) también describieron un inhibidor de amilasa a partir de un extracto acuoso de endospermo de trigo y centeno. Este inhibidor actúa contra la α -amilasa de la saliva, del páncreas y de las bacterias, pero no tiene efecto contra la amilasa de hongos y de la malta. También se encontró un inhibidor de la α -amilasa de la cebada y trigo y de bacterias en ciertas variedades de sorgo.(1)

Marshall y Lauda (1975) probaron la actividad del inhibidor de la α -amilasa en leguminosas y lo purificaron a partir de una especie de frijoles que presentan gran cantidad de este inhibidor el cual tiene el nombre de faseolamina.(12)

Igualmente se han descrito inhibidores de la coli-

nesterasa. Entre los alimentos que inhiben "in vitro" la actividad de la colinesterasa se encuentran: brocolí, espárragos, papas, nabos, rábanos, apio, zanahoria, naranja, manzana, frambuesa. Los inhibidores se encuentran en diversas partes de la planta: en la papa se encuentra en el tubérculo y en las hojas; en el nabo, rábano, apio y zanahoria se encuentra en toda la planta, en la manzana y la naranja se encuentra en el fruto y en la frambuesa se encuentra en las hojas. Se ha requerido de diferentes solventes para extraer a la sustancia activa, por lo que se deduce que no son químicamente idénticos. Se conoce poco acerca de la naturaleza química de estos inhibidores. Un inhibidor de la colinesterasa se ha identificado como el glucósido solanina el cual esta presente en altas concentraciones en la cáscara y en los retoños de las papas (especialmente cuando estan verdes). Se han reportado muertes humanas, provocadas por el consumo de papas verdes y se ha probado que la solanina es el agente responsable. Se han obtenido valores de solanina de 38 a 45 mg en papas, cantidad suficiente para provocar la muerte por envenenamiento. Esos valores se pueden comparar con los normales de 3 a 6 mg por 100 g que generalmente se encuentran en las papas. Es importante observar que la solanina no se destruye por cocimiento por lo cual se ha observado envenenamiento aún con papas cocidas.(1)

Un inhibidor de la invertasa se encontró también en

15-28

el tubérculo de la papa. Este inhibidor ya purificado actúa como un inhibidor no competitivo. Tiene propiedades características de una proteína. Se sabe que su pH óptimo es de 4.7, es insoluble en sulfato de amonio al 35%, es termolábil y se desnaturaliza a 50°C. (14)

Recientemente se aisló un inhibidor específico de la subtilisina, a partir de frijoles negros silvestres y ya se han descrito algunas de sus propiedades físicas y químicas. (15)(16)

INHIBIDORES DE TRIPSINA

Quizá los factores tóxicos más conocidos que tienen las leguminosas son los inhibidores de tripsina, llamados así por su habilidad para inhibir la actividad de la enzima tripsina, la cual se encuentra en el tracto digestivo de animales y del hombre. (1)

La tripsina es una enzima segregada por el páncreas y penetra en el intestino por el conducto pancreático en forma de zimógeno inactivo, tripsinógeno. Este se convierte en su forma activa, tripsina, en el intestino, por acción de la enteroquinasa, enzima proteolítica segregada por el intestino o también se activa por la propia enzima. Esta conversión ocurre por separación de un hexapéptido del extremo NH₂-terminal del tripsinógeno. Su pH óptimo es de 7 y es muy específica ya que escinde todos los enlaces peptídicos de la proteína sustrato, cuyos grupos

carbonilo son aportados por la arginina y la lisina, dondequiera que estén situados en la cadena. La tripsina, es por tanto, una endopeptidasa.(9)(29)

Poco tiempo después que la soya se introdujo en los Estados Unidos, Osborne y Mendel (1917) observaron, al utilizar dietas experimentales preparadas con harina de soya, que sólo después de una cocción prolongada este material exhibe un valor nutritivo satisfactorio. Las ratas o pollos alimentados con raciones que contienen soya cruda tienen un crecimiento menor que el de los controles que ingieren una dieta similar pero con soya sometida previamente a un tratamiento en autoclave.

Read y Haas (1938) fueron los primero en reconocer la presencia de un inhibidor de tripsina en material vegetal. Observaron que un extracto acuoso de harina de soya inhibía la habilidad de la tripsina para licuar la gelatina. La fracción de proteína responsable de este efecto fue parcialmente purificada por Bowman (1944) y posteriormente aislada y cristalizada por Kunitz (1945, 1946). Después de esto, lógicamente se asumió que el inhibidor de tripsina era la sustancia responsable del valor nutritivo pobre que presenta la soya cruda.(1)(17)

Se hicieron muchos estudios para aclarar esto y los múltiples resultados contradictorios que se obtuvieron, contribuyeron a complicar el cuadro y dieron origen a múltiples hipótesis. La razón de estas contradicciones, so-

bre todo después de revisar diferentes artículos, puede atribuirse a las condiciones experimentales, que se relaciona con factores tales como la especie del animal con el que se experimenta, así como su edad y sexo y la composición de las dietas empleadas.

La primera hipótesis que surgió, fue que parecía muy probable que la destrucción de estos inhibidores podría ser la causa del mejoramiento en el valor nutritivo de las semillas. Se observó que los índices de digestibilidad de las especies con el mayor contenido de inhibidores tripsínicos eran los más bajos.

De acuerdo con el concepto clásico de valor nutritivo de una proteína, el cual se determina por su composición en aminoácidos, numerosos estudios han demostrado, que la suplementación de la proteína cruda con diferentes aminoácidos, puede llevar al mismo efecto que cuando esta cocida. Se demostró que la adición de metionina o cistina a la harina de soya cruda mejora la utilización de la proteína en el mismo grado que la proteína cocida.

Melnick (1946) en base a experimentos "in vitro" relacionó la liberación de aminoácidos a partir de la proteína de la soya por la pancreatina; sugirió que la metionina de la soya cruda se libera más lentamente por las enzimas proteolíticas del intestino en comparación con otros aminoácidos. Existen otras observaciones que no están de acuerdo con esta hipótesis. Otros estudios han demostrado

que el inhibidor de tripsina no retarda específicamente la liberación de metionina sino que parece afectar la de todos los aminoácidos en el mismo grado. Goldberg y Guggenheim (1962) observaron que diferentes aminoácidos, incluyendo la lisina y triptofano, así como metionina, son absorbidos en forma más lenta por el intestino. Almquist y Merrit observaron que hay una interferencia específica en la liberación enzimática de la metionina para explicar las deficiencias de este aminoácido causadas por la soya cruda.

Chernick (1948) fue el primero en demostrar que los pollos alimentados con soya cruda desarrollan una hipertrofia en el páncreas. Esta observación no sólo se comprobó en pollos, sino también en ratas, pero no se observó ni en vacas ni en cerdos. La hipertrofia pancreática puede ser producida alimentando a animales con dietas que contengan puro el inhibidor de Kunitz o el de Bowman-Birk. Un examen histológico y bioquímico del aumento de tamaño del páncreas reveló una verdadera hiperplasia, la cual se caracteriza por un incremento en el número de células en el tejido pancreático, pero al mismo tiempo hay evidencia de que los gránulos zimógenos se encuentran agotados. Otros investigadores creen que el aumento del tamaño del páncreas es el resultado de un incremento en el tamaño de la célula y no en el número de células. (1)

Gertler y colaboradores lograron producir hipetro-

fia pancreática en pollos y ratas agregando simultáneamente inhibidor trípico y quimotrípico de soya a las dietas correspondientes. La reducción del crecimiento fue muy poca y mucho menor que la causada por la adición de soya cruda.(18)

Sambeth y colaboradores observaron hipertrofia pancreática y simultáneamente una contracción de la vesícula biliar después que se consumían dietas que contenían fracciones de soya con actividad antitripica o inhibidor de tripsina puro. La hipertrofia pancreática se acompaña de una excreción de enzimas digestivas y puede dar por resultado una pérdida de nitrógeno fecal. En las leguminosas sin actividad de inhibidor trípico no se encontró acción sobre el páncreas.(19)

Se ha establecido una relación más directa entre el inhibidor de tripsina de la soya y la utilización de metionina. Kwong y Barnes (1963) investigaron el efecto de la administración del inhibidor al metabolismo de la metionina. Usando metionina radioactiva demostraron que seguida de una dosis de inhibidor de tripsina hay un incremento en la conversión de metionina a cistina y CO_2 metabólico. Este incremento en la síntesis de cistina tiene lugar en el páncreas. Otros experimentos condujeron a diferentes hipótesis, que el inhibidor de tripsina interfiere con la incorporación de cistina dentro de las proteínas por un bloqueo directo de la enzima cistationín-

sintetasa. (20)

Borchers (1965) estudió el efecto de la soya cruda en el metabolismo de diferentes aminoácidos y concluye por sus resultados que algunos factores de la soya interfieren en el catabolismo de la treonina y la valina.

Observando todo esto es necesario óstular que los inhibidores de tripsina tienen una relación directa con el metabolismo de ciertos aminoácidos. El incremento en la actividad secretoria del páncreas que acompaña a la ingestión de inhibidores de tripsina, puede dar por resultado un incremento en la síntesis de enzimas por el páncreas, la cual se sabe que es rica en cistina. Esto se observa por las cantidades desproporcionadas de cistina que se encuentran en el intestino delgado después que las ratas han recibido soya cruda. Como la cistina se deriva de la metionina la síntesis enzimática del páncreas puede acentuar los requerimientos de metionina por otros tejidos del cuerpo. (1)

Para poder elucidar la importancia nutricional de los inhibidores de tripsina de la soya, se encontró que hay otros inhibidores del crecimiento en la soya cruda. Se llegó a esta conclusión ya que con la complementación de aminoácidos hecha a la soya cruda no se elimina la inhibición del crecimiento. Tampoco se ha explicado el hecho de que el valor nutritivo de la soya germinada sea superior que el de la harina cruda, ya que el contenido de inhibidores

de tripsina no cambia; parece ser que la retención de me-
tionina es mayor en animales que consumen la dieta de so-
ya germinada comparada con los animales alimentados con
soya cruda.(11)

Especificidad, Estequiometría y Reacción Cinética de
los Inhibidores.

2 — Kunitz (1947) fue el primero en demostrar que la inhi-
bición de la tripsina por el inhibidor de tripsina de soya
cristalizado, es directamente proporcional a la cantidad
de inhibidor adicionado, y que el inhibidor puro neutrali-
za aproximadamente un peso igual que el de la tripsina
cristalizada. De aquí que el peso molecular del inhibidor
de Kunitz y el de la tripsina, sea aproximadamente el mis-
mo (24,000), y la relación molar se considera generalmen-
te 1:1.

La reacción del inhibidor de Kunitz con la tripsina
es casi instantánea, su constante de velocidad es de 2o.
orden y es de 2×10^7 litros/moles/seg. El complejo trip-
sina-inhibidor de tripsina tiene poca tendencia a diso-
ciarse excepto a valores bajos de pH (2.9)'. Es por esto
que su constante de disociación es muy baja $2 \times 10^{-10} M$;
fue por eso que se pensó que la inhibición de la tripsi-
na por el inhibidor de Kunitz era no competitiva. Sin em-
bargo, se comprobó que la inhibición es competitiva, con
pequeñas moléculas de sustrato tales como N-benzoil-L-ar-

ginina etil ester, ya que la reacción del inhibidor de Kunitz con tripsina es casi anulada en presencia de este sugtrato.

Se han reportado otras proteasas que son inhibidas por el inhibidor de Kunitz pero se ha observado que éstas son parecidas a la tripsina en lo que se refiere a la especificidad de sustrato.

En contraste con el inhibidor de Kunitz, el inhibidor de Bowman-Birk, insoluble en acetona, no solo inhibe estequiometricamente a la tripsina, sino que es 13 veces más activo contra la quimotripsina. Una observación interesante es el hecho de que el complejo tripsina-inhibidor de tripsina es capaz de inhibir la quimotripsina y recíprocamente mantiene su habilidad para inhibir la tripsina. Esto ha sugerido que el inhibidor posee dos sitios independientes para combinarse. Este inhibidor no inhibe ni la papaína ni a la pepsina.

Los inhibidores de soya (α , B_1 y B_2) descritos por Rackis y Anderson (1964) reacciona estequiometricamente con la tripsina. En base a su peso los inhibidores pueden ser más activos contra la tripsina que el inhibidor de Kunitz.

El inhibidor aislado a partir de algunas especies de *Phaseolus vulgaris* por Honavar y Johonie (1959) reportan una combinación no competitiva con la tripsina en una relación molar de aproximadamente 1:1. El complejo

tripsina-inhibidor de tripsina parece disociarse bajo pH 5. La papaína es ligeramente inhibida pero la pepsina y quimotripsina no son inhibidas. El inhibidor aislado por Chu y Chi (1965) a partir de frijol mungo se piensa que actúa competitivamente especialmente en sustrato ester. (1).

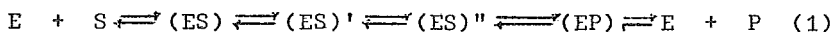
Mecanismo de Interacción con Proteasas.

La forma en que se combinan los inhibidores de proteasas con ciertas enzimas ha sido objeto de estudios considerables ya que sugiere un excelente modelo para estudiar una interacción proteína-proteína. Kunitz demostró que la combinación del inhibidor de Kunitz con la tripsina se acompaña de una disminución en la cantidad de grupos amino libres, esto sugiere que la interacción ocurre en los grupos iónicos. Los datos de sedimentación indican que a valores bajos de pH (2.9), donde los grupos carboxilo no están fuertemente cargados, el complejo inhibidor de tripsina-tripsina esta completamente disociado. La parte química de los grupos amino libres del inhibidor de Kunitz no interfiere con su habilidad para inhibir la tripsina. Se determinó también cual de los residuos aminoácidos de la tripsina esta relacionado con la formación del complejo del inhibidor de Kunitz. La actividad de la tripsina en la que el grupo amino se acetila, o se politirosila es aún inhibida por el inhibidor de Kunitz. La tripsina, la cual es inactiva con reactivos que se sabe que se combinan con algunos

componentes de su sitio activo ya no es capaz de formar el complejo con el inhibidor de Kunitz. La tripsina se inactiva por tratamiento con diisopropilfosfluorhidrato, reactivo que actúa específicamente con los residuos serina e histidina respectivamente, localizados como sus sitios activos.(1)

Una contribución importante para entender mejor el mecanismo de interacción entre los inhibidores de tripsina y la tripsina, fue dada por Laskowski y sus colaboradores. Ellos observaron que la 1a. etapa de interacción de la tripsina y el inhibidor de Kunitz se relaciona con la ruptura específica de la ligadura arginina-isoleucina, atacando la ligadura disulfuro del inhibidor de Kunitz. El inhibidor modificado es aún activo, pero eliminando la formación del residuo C-terminal por tratamiento con una carboxipeptidasa se produce un derivado inactivo. Cuando el inhibidor modificado se reduce y se carboximetila, se forman dos fragmentos, uno que tiene 64 residuos y otro con 134. Estas observaciones están representadas en el esquema No. 1 .

El mecanismo de acción de las proteasas sobre un sustrato específico, generalmente se formula de acuerdo al siguiente esquema:



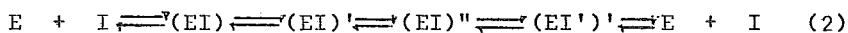
donde:

(ES) y (EP) = complejos de Michaelis (enzima sustrato y enzima producto, respectivamente).

(ES)' = estado de transición intermedio en forma tetrahédrica.

(ES)" = intermediario acyl-enzima.

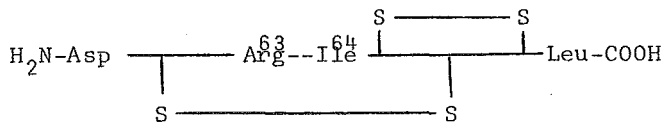
Existen evidencias de que los inhibidores de proteasas funcionan de modo análogo sobre el sustrato y puede escribirse:



donde:

(EI)' = complejo inactivo en forma tetrahédrica, que en el caso del inhibidor de tripsina y la tripsina involucra arginina-63 del inhibidor de Kunitz y el sitio activo del residuo serina de la tripsina.

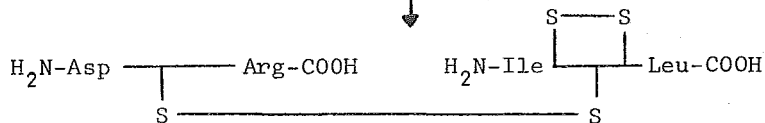
Este complejo puede disociarse por control cinético, y dar principalmente el inhibidor virgen, I. El tratamiento del inhibidor de Kunitz con cantidades catalíticas de tripsina bajo condiciones ácidas da un inhibidor modificado, I', el cual ahora presentará ruptura proteolítica entre la arginina-63 y la isoleucina-64. Si la ecuación No. 2 es válida, la manera en que se genera el I', necesariamente incluye la formación del acyl-intermediario, (EI)". En este trabajo se presentaron evidencias de que una pequeña fracción del complejo inhibidor de tripsina-tripsina es un



Inhibidor "virgen" (activo)

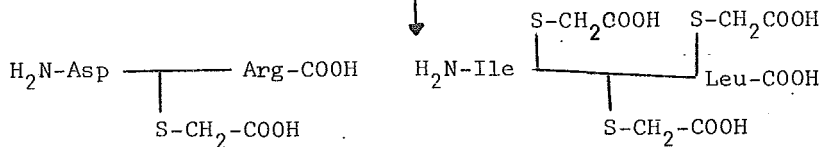
Tripsina

pH = 3.75



Inhibidor "modificado" (activo)

Reducción y
Carboximetilación



Dos fragmentos inactivos.

acyl-intermediario (una ligadura ester que involucra un grupo carboxil de la arginina-63 y el residuo serina de la tripsina) y se encuentra en equilibrio con la especie tetrahedrica dominante. (21)(22)

Birk (1967) demostró que la interacción del inhibidor de Bowman-Birk insoluble en acetona, con la tripsina bajo las condiciones descritas por Laskowski, producen un inhibidor modificado el cual retiene la habilidad para inhibir tanto a la tripsina como a la quimotripsina. Si después se trata al inhibidor modificado con carboxipeptidasa, la capacidad para inhibir a la tripsina se elimina, pero no la de la quimotripsina. Este experimento presenta fuertes evidencias de la naturaleza dual independiente de los sitios responsables de la inhibición de la tripsina y de la quimotripsina. (1)

Factores que afectan el contenido del inhibidor de tripsina.

W Tratamiento térmico.- El grado de destrucción de los inhibidores de tripsina por el calentamiento, es una función de la temperatura, duración del calentamiento, tamaño de partícula y condiciones de humedad. En general, en autoclave con una atmósfera de vapor de 15 lb/in² durante 15 a 20 minutos se inactiva casi completamente el inhibidor de tripsina del frijol de soya. Si los frijoles se remojan toda la noche evaporando a presión

atmosférica se inactiva el inhibidor de tripsina.

Germinación.- Aunque se sabe que este fenómeno causa un mejoramiento en el valor nutritivo de la soya, y en un gran número de leguminosas, este efecto parece no estar relacionado con algún cambio en la actividad del inhibidor de tripsina en la semilla germinada.

Fermentación.- Se ha reportado que el valor nutritivo de los preparados de frijol de soya, tales como el tempeh y natto, se mejora. Este descubrimiento coincide con la observación de que el páncreas no aumenta de tamaño en ratas que son alimentadas con dietas que contienen tempeh, lo que indica que el inhibidor de tripsina fue destruido pero debido al tratamiento térmico que se lleva a cabo en la preparación de estos productos (los frijoles son hervidos durante 30 minutos antes de la fermentación).
(11)(23)

Aislados de frijol de soya.- Recientemente se ha dado mayor atención a las propiedades nutricionales de los aislados de soya y texturizados de carne. Aunque se ha reportado que la calidad nutritiva de esos alimentos texturizados es esencialmente equivalente a la caseína o a la carne de res, la eficiencia de la proteína del aislado original es muy baja, pero puede mejorarse por tratamiento térmico. Esos resultados indican la posible presencia de

inhibidores de crecimiento en el aislado de proteína, los cuales se inactivan durante el proceso en que el aislado se convierte en fibra.(17)

ELECTROFORESIS

Es posible separar mezclas de proteínas globulares en disolución basándose en sus diferentes velocidades de emigración en un campo eléctrico, a un pH determinado. La movilidad eléctrica μ de una molécula esta dada por la relación entre la velocidad de emigración V y la fuerza del campo E, expresada en cm^2 por volt-seg:

$$\mu = \frac{V}{E}$$

Existen dos métodos para llevar a cabo la electroforesis de mezclas de proteínas. En la electroforesis libre o de frente móvil la solución buffer con la mezcla de proteína se coloca en una célula de observación en forma de U, y se depositan cuidadosamente capas de disolución tampón pura sobre la disolución de proteínas. Se aplica un campo eléctrico a temperatura constante y exento de vibraciones. El pH debe ser óptimo para que la separación de proteínas sea mejor. Cuando la proteína emigra desde la disolución a la zona tampón libre de proteína se forma un frente que se mueve hacia el electrodo. El índice de refracción de la disolución cambia ya que las moléculas de proteína tienen un pH distinto al del tampón puro. Se

miden los cambios del índice de refracción a lo largo de toda la célula por un método llamado interferométrico y se construyen diagramas electroforéticos que indican la dirección y la velocidad relativa de emigración de cada especie proteica.

El segundo tipo de electroforesis es la electroforesis de zona. Aquí la electroforesis de la disolución acuosa de proteína se realiza generalmente en una matriz sólida como papel de filtro, gel de almidón o gel de poliacrilamida, materiales que son hidratados y porosos, pero que poseen rigidez mecánica. Para poner de manifiesto la frontera entre la proteína y el tampón se hace por medio de coloraciones cualitativas. (9)

Electroforesis en Gel.

Se han producido técnicas de electroforesis en gel para separar mezclas de proteínas en un campo eléctrico ya que estos compuestos son polielectrolitos cuyas cargas dependen del valor del pH del medio circundante. La movilidad de una proteína en un campo eléctrico, depende del número de cargas que presente, el signo de las cargas netas, el grado de disociación (que es una función del pH) y la magnitud del potencial del campo eléctrico. La resistencia que se opone a la movilidad de la molécula proteica esta relacionada con el tamaño y la forma del ión, la solubilidad de la proteína, la viscosidad del me-

dio, la concentración del ión y las propiedades adsorbentes del medio que sirve de vehículo. Este método se ha desarrollado en forma notable, ya que emplea equipo barato, es rápido y sumamente sensible.

El medio que sirve de soporte, que es más útil y que actualmente se emplea con mayor frecuencia es el polímero de la acrilamida unida a N,N-dimetil-bis-acrilamida. Este método resulta muy útil por el llamado "tamaño de poro", es decir, que el gel actúa como un tamíz en forma directamente relacionada con su concentración. Así, al aumentar la concentración del gel desde 3% hasta aproximadamente 9-10%, el tamaño del poro disminuye y las proteínas se movilizan más lentamente. Por medio de esta simple variante se puede alterar la movilidad de las proteínas cargadas y con ello resulta posible estudiar las proteínas de una gran variedad de tamaños.(24)

O B J E T I V O

El objetivo de este trabajo es determinar cualitativamente la presencia de inhibidores de tripsina por un método microelectroforético, el cual desarrolla zonas de inhibición fácilmente apreciables.

Al mismo tiempo se determinará si las características de estas zonas de inhibición, como son: forma, tamaño y posición están relacionadas con parámetros tales como la concentración de proteínas extraídas y el contenido de inhibidores de tripsina determinados por el método colorimétrico.

PARTE EXPERIMENTAL

I).- MATERIALES

a).- Para este estudio se utilizaron 13 semillas de leguminosas. En el cuadro No. 1 se enumeran las 13 muestras con su nombre científico.

b).- Forma en que se utilizaron las muestras.

Las muestras se limpiaron y se molieron en un molino Wiley de laboratorio. Se usó una malla de 1 mm y en la harina así obtenida se realizaron las determinaciones.

II).- METODOS

A las muestras se les hicieron las siguientes determinaciones:

a).- Determinación de la concentración de proteínas.

b).- Determinación de Inhibidores de tripsina.

c).- Determinación de inhibidores de tripsina por Microelectroforesis.

DETERMINACION DE CONCENTRACION DE PROTEINA.

La determinación de proteína en el extracto se realizó por el método de Lowry modificado por Hartreé.(25)

Es un método colorimétrico que se basa en la formación de un complejo de color azul de cobre, sodio y pota-

CUADRO NO. 1

NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO
*	Eritrina michoacana
Frijol colorín	Eritrina mexicana
Frijol del monte	Phaseolus lunatus
Frijol escumite	Phaseolus acutifolius
Frijol patashete	Phaseolus lunatus
Frijol de soya	Glycine max
Guaje morado	Leucaena pulverulenta
Guaje verde	Leucaena macrocarpa
Guamuchil	Pithecellobium dulce
Jinicuil	Inga sp
Lenteja	Lens esculenta
Maguacata	Pithecellobium flexicaule
Palo fierro	Pithecellobium undulatum

*No se conoce el nombre común.

sio con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Reactivos

A.- Tartrato de sodio y potasio	2.0 g
Carbonato de sodio	100.0 g
Hidróxido de sodio 1 M	500.0 ml
B.- Tartrato de sodio y potasio	2.0 g
Sulfato de cobre	1.0 g
Hidróxido de sodio 1 M	10.0 ml
C.- Reactivo de Folin-Ciocalteu	1.0 ml
Agua destilada	15.0 ml

Técnica.

- 1.- Diluir la muestra a un volumen final de 1 ml.
- 2.- Agregar 0.9 ml del reactivo A a cada tubo.
- 3.- Incubar 10 minutos a 50°C y dejar enfriar 12 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Añadir 0.1 ml del reactivo B, dejar reposar 10 minutos.
- 5.- Añadir 3 ml del reactivo C, incubar 5 minutos a 50°C. Agitar y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 6.- Leer absorbancia a 500 nm.

Se debe hacer una curva estándar de albúmina de suero bovino de la siguiente manera:

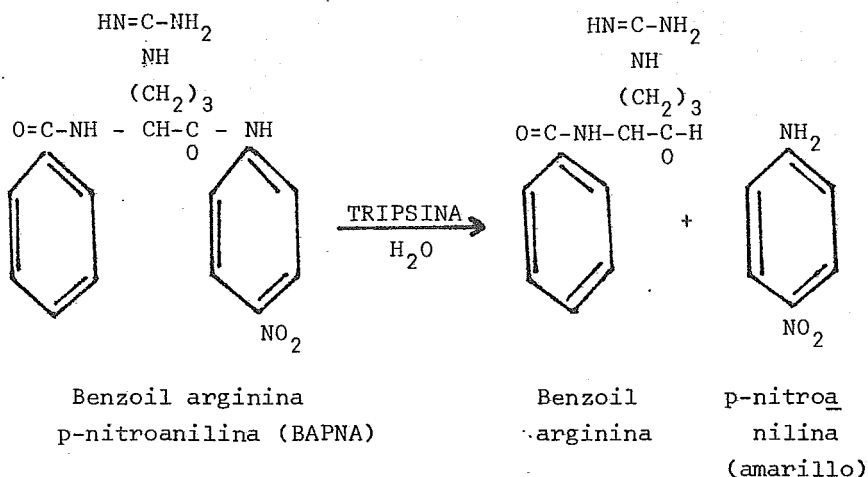
- 1.- Tomar alicuotas de 0.1 - 1.0 ml de una solución estándar de suero bovino (100 microgramos por ml) pipeteando por duplicado en tubos de ensayo.
- 2.- Se diluye la solución a un volumen final de 1 ml.
- 3.- Hacer los mismos pasos que para la determinación a partir del No. 2.

DETERMINACION DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

Esta determinación se realizó siguiendo el método descrito por Kakade y col. (26)

Es una determinación "in vitro". La tripsina al estar en contacto con un sustrato sintético, BAPNA (benzoil arginina p-nitroanilina), lo hidroliza liberando benzoil arginina y p-nitroanilina de color amarillo.

De acuerdo a la siguiente reacción:



Si existen inhibidores de esta enzima en los extractos de estas muestras, la inhibición de la tripsina ocasiona que disminuya la cantidad de p-nitroanilina liberada; por lo tanto la decoloración es inversamente proporcional a la concentración del inhibidor de tripsina presente en los extractos de las muestras.

Reactivos

A.- Solución amortiguadora de tris 0.05 M, pH = 8.2

Se pesan 6.05 g de tris (hidroximetil-aminoetano) y 2.94 g de cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Se disuelven por separado el agua destilada y se mezclan en un volumen total de 900 ml, se ajusta el pH a 8.2 y se afora a 1000 ml con agua destilada.

B.- Solución BAPNA (benzoil arginina p-nitroanilida) 3 mM. Primero se prepara una solución BAPNA 0.04 M, para esto se pesan 870 mg de BAPNA (Sigma Co., St. Louis Mo.) y se disuelven en 50 ml de dimetil sulfóxido. Debe cuidarse que la disolución sea completa para evitar que los residuos de cristales que no se disolvieron, precipiten al reactivo. Esta solución puede guardarse en refrigeración para después obtener la solución 3 mM. Para preparar la solución BAPNA 3 mM, solo se toman 3.75 ml de la solución amortiguadora de tris. Esta solución se prepara en el momento de usarse.

C.- Solución estándar de tripsina, 40 microgramos/ml.

Se pesan exactamente 4 mg de tripsina (Tipo 2, Sigma Co., St. Louis Mo.), cristalizada dos veces y libre de sales, y se disuelven en 100 ml de HCl 0.001M. Esta solución se puede guardar en refrigeración por dos o tres semanas sin que pierda su actividad.

D.- Acido acético 30%.

Técnica.

Se pesa 1 g de muestra molida, se le adicionan 45 ml de NaOH, 0.01N y se ajusta el pH a 9.6. Se afora a 50 ml y se agita durante 1 hora mecánicamente. Se centrifuga y se toma una alícuota de 5 ml del sobrenadante y se afora con agua destilada a 50 ml. Del extracto obtenido se emplean alícuotas de 1 ml para la determinación.

Para la determinación se siguen los siguientes pasos:

- 1.- Se toman alícuotas de 1 ml de cada uno de los extractos de las muestras.
- 2.- A todos los tubos se les agrega 1 ml de solución estándar de tripsina.
- 3.- Los tubos se colocan en un baño a 37°C.
- 4.- A uno de los tres tubos de cada muestra se le agrega 1 ml de ácido acético al 30%, que servirá como blanco correspondiente.
- 5.- Dejar reposar 5 minutos para estabilizar la temperatura.

- 6.- A cada uno de los tubos se les agregan 2 ml de solución de BAPNA 3 mM.
- 7.- Se deja reposar 15 minutos para que la reacción se lleve a cabo.
- 8.- A los tubos que no tienen, se les añade 1 ml de ácido acético al 30%, para preparar la reacción.
- 9.- Se sacan los tubos del baño y se agitan.
- 10.- Leer absorbancia a 420 nm.

Al mismo tiempo debe correrse una curva estándar de tripsina.

- 1.- Se toman alicuotas de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ml, de solución estándar de tripsina, pipeteando por triplicado.
- 2.- Se agrega la cantidad de agua destilada a todos los tubos, necesaria para completar un volumen final de 2 ml
- 3.- Se siguen los mismos pasos a partir del No. 3 de la determinación de la muestra.

La actividad antitripsina puede expresarse en dos formas diferentes:

- a).- Los resultados de los problemas se leen directamente en la curva estándar y se reportan como miligramos de tripsina inhibida por gramo de muestra.
- b).- La actividad antitripsina se define también como

el número de Unidades de Tripsina Inhibida (UTI).

Las UTI/mg de muestra se obtienen restando la densidad óptica de cada problema, de la densidad óptica del último punto de la curva estándar, equivalente a 1 ml de solución estándar de tripsina.

Posteriormente se hace la relación con:

$$1 \text{ UT} = 0.01 \text{ unidades de D.O.}$$

$$\text{UTI} = \frac{(\text{D.O. de } 40 \text{ g} - \text{D.O. problema})}{0.020}$$

DETERMINACION DE INHIBIDORES DE TRIPSINA POR MICRO-ELECTROFORESIS.

Esta determinación se realizó siguiendo el método descrito por W.G. Jaffé y col. (27)

Se utilizó el equipo de electroforesis CAMAG modelo 81 013, el cual consta de: (Fig. No. 1)

-Puentes de electroforesis, cada puente sostiene 6 portaobjetos. (Fig. No. 2)

-Cubeta o cámara de electroforesis CAMAG universal modelo 81 130. (Fig. No. 3)

-Mesa para nivelar los puentes de electroforesis. (Fig. Nos. 4 y 5)

-Porta-puentes CAMAG modelo 83 522. (Fig. No. 6)

-Fuente de poder de 0 - 500 V, con tiempo, CAMAG modelo 67 802. (Fig. No. 1)



FIGURAS

Fig. 1

A = Fuente de Poder

B = Cubeta o Cámara de Electroforesis

Fig. 2

A = Puentes para Electroforesis

B = Portaobjetos

C = Espacios entre portaobjetos que deben sellarse
con agar.

Fig. 3

A = Cuba de Electroforesis

B = Puentes de Electroforesis

C = Papel Filtro

D = Solución de Buffer Veronal

Figs. 4 y 5

A = Mesa para nivelar los Puentes

B = Puentes de Electroforesis

Fig. 6

A = Porta Puentes

B = Puentes de Electroforesis

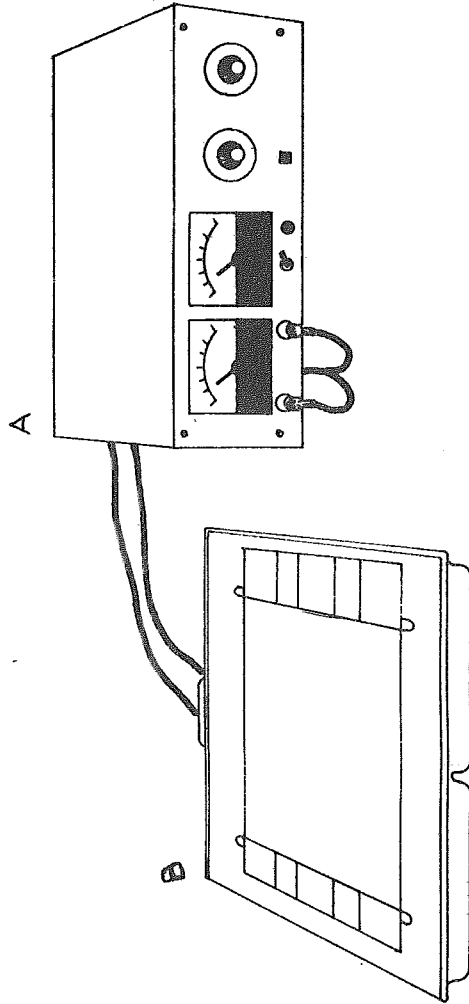


Fig. No.1

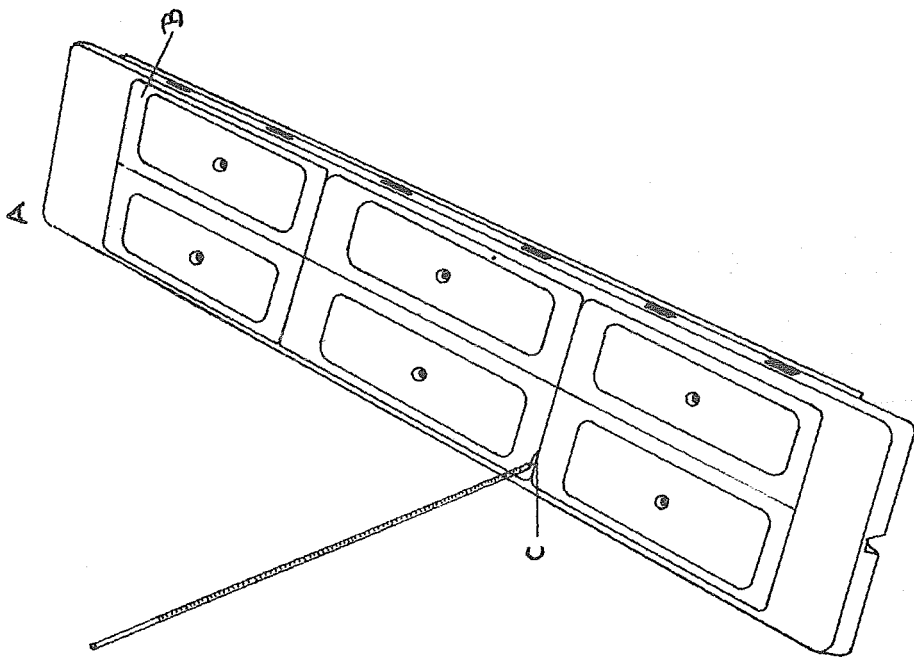


Fig. No.2

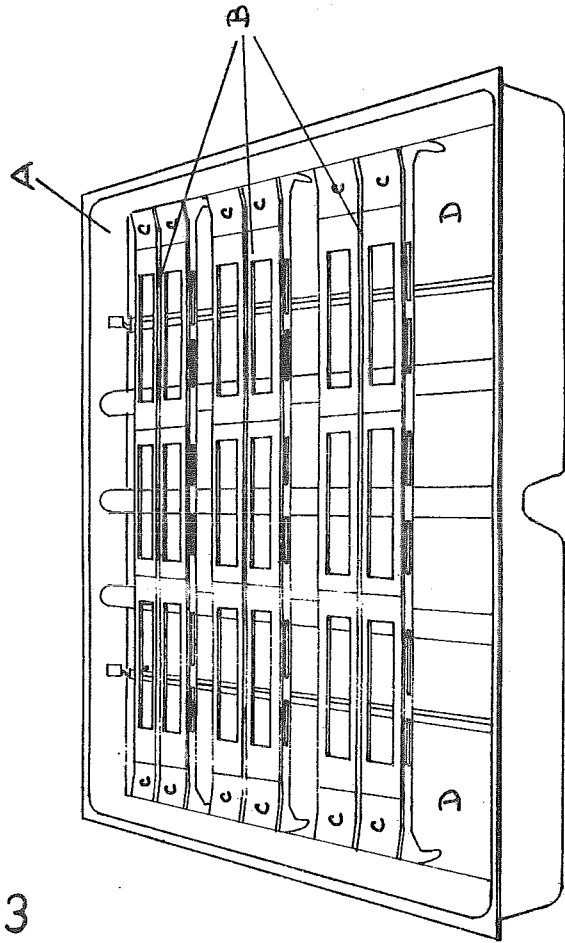


Fig. No. 3

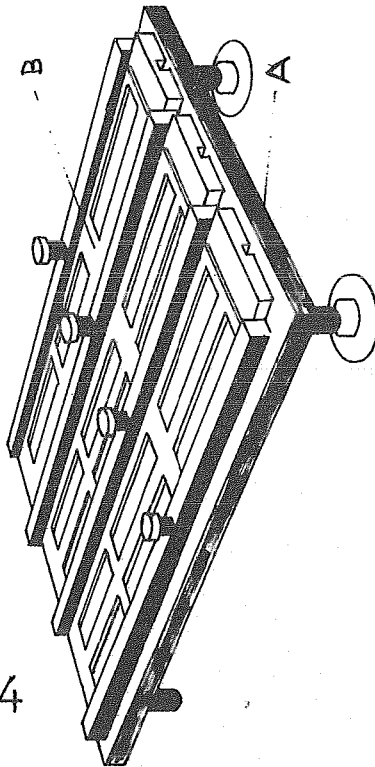


Fig No 4

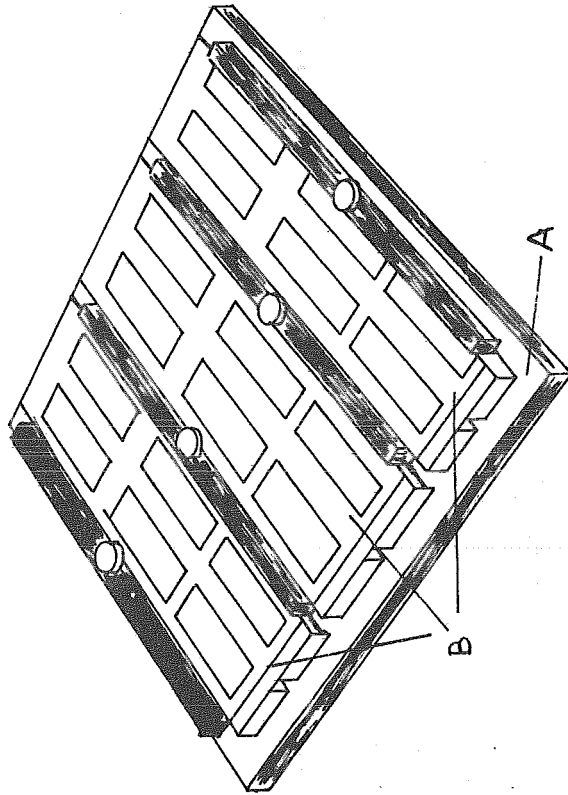


Fig No. 5

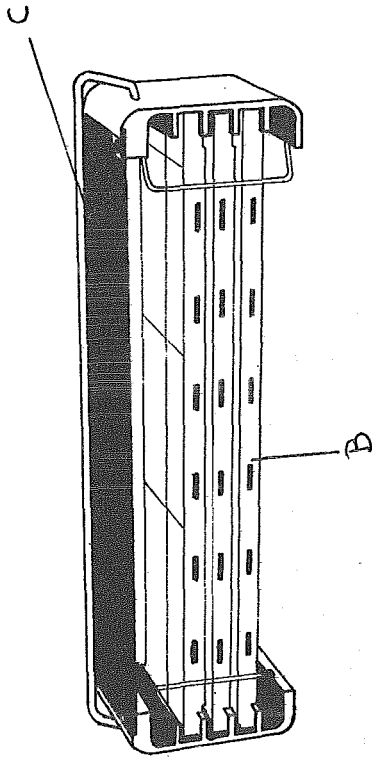


Fig. No. 6

Reactivos

A.- Preparación de agar-agar al 2.5%.

- 1.- Se pesan 200 g de agar-agar.
- 2.- Se agrega agua destilada y se homogeniza. Se decanta y se lava varias veces hasta que el agar quede claro. Se agrega el volumen que falta de agua para preparar la solución al 2.5%.
- 3.- Se lleva al autoclave para fundirlo.
- 4.- Se saca y se vierte en charolas con 2 cm de espesor y se deja solidificar.
- 5.- Se corta en cuadros.
- 6.- Se pasa a matraces y se cubre con NaOH 0.2N. Se deja así por 24 horas.
- 7.- Se deja al chorro de agua hasta quitarle el color que tomó (marrón o negro). Cuando ya esta de color blanco se lava varias veces con agua destilada y se guarda en frascos en el refrigerador para preparar las placas.

B.- Buffer veronal sódico, pH = 8.2, 0.01M.

Veronal sódico	19.618 g
Acetato de sodio	12.952 g
Acido clorhídrico 0.1N	120.0 ml
Aforar con agua destilada a	2,000.0 ml

Se ajusta el pH con HCl

Tarda un día aproximadamente para estabilizarse.

Rango de pH = 8.2 - 8.6

El buffer se diluye 1:1 para ser empleado después.

C.- Solución de caseína al 0.2% en buffer veronal 1:1.
Se pesa la caseína y se agregan más o menos 20 ml de buffer veronal y a baño maría se agita hasta disolver. Se agita y se afora. Se guarda en refrigeración.

D.- Solución de CaCl_2 al 0.1% en buffer veronal 1:1
de pH = 8.2

Preparación de extractos.

- 1.- Se muelen los granos de cada muestra.
- 2.- Se agitan 2 horas magneticamente con buffer veronal (1:1).
- 3.- Se centrifuga a 5,000 R.P.M.
- 4.- El sobrenadante se filtra.

Con el extracto así preparado se hacen todas las determinaciones.

Esto es una modificación al método original (27), en el cual la extracción se lleva a cabo con agua y luego se evapora a sequedad a vacío a una temperatura de 37°C. En este caso se probó realizar la extracción con el buffer veronal directamente, obteniéndose resultados satisfactorios.

En los extractos se necesita una concentración de 50 mg de proteína/ml. Suponiendo que la muestra tiene 20% de proteína se hacen los siguientes cálculos:

20 g de prot ----- 100 g muestra

x ----- 1 g

x = 0.2 g proteína = 200 mg prot

Para 50 mg prot ----- 1 ml de buffer

200 mg prot ----- x

x = 4 ml de buffer veronal

Preparación de las placas.

Sin caseína

1.- 17 ml de agar

2.- 1.8 ml de CaCl_2 , 0.01%

3.- 3.6 ml de buffer veronal, pH = 8.2 (1:1)

Con caseína

1.- 18 ml de agar

2.- 1.8 ml de CaCl_2 , 0.1%

3.- 3.6 ml de caseína al 0.2%

Técnica.

Se colocan 6 portaobjetos en cada marco del equipo de electroforesis. Los espacios entre los bordes de los portaobjetos se sellan con una solución caliente de agar al 2.5% para evitar fugas. (Ver Fig. No. 2). Entonces las placas se cubren uniformemente con 16 - 18 ml de la solución de agar-caseína caliente. Después que se solidifica la placa,

se hacen unas perforaciones de aproximadamente 5 mm de diámetro sobre el gel en cada portaobjetos o placas y en cada una de ellas se introducen 5 microlitros del extracto de la muestra el cual tiene una concentración entre 20 y 50 mg de proteína/ml.

Se llevan los puentes a la cuba de electroforesis, de cada lado de los puentes o marcos, se coloca un papel filtro que esté sumergido dentro del buffer, para que pase a través del gel una corriente de 200 V (32 mA) por un período de 2 horas. (Ver Fig. No.3). Se corre un blanco en cada muestra, donde la caseína se sustituye en la solución de agar por el buffer veronal; todas las demás condiciones permanecen iguales.

Son suficientes de 6 a 7 corridas para cambiar el buffer de la cuba de electroforesis. Esto se puede ver cuando se pasa de los 32 mA.

Después de cada corrida se invierte la polaridad de la corriente.

Medición del Inhibidor de Tripsina

Después de la electroforesis las placas se cubren totalmente con unas tiras de papel filtro empapadas en una solución de la proteinasa y se incuban por 1 hora a 37°C en una cámara húmeda. Al cabo de este tiempo las tiras de papel se quitan; el gel se tiñe con amido negro al 0.1%, esto se lleva a cabo sumergiendo las placas en la solución

del colorante durante un período de 30 minutos. Se destiñe con ácido acético al 7% y se lava tres veces con agua destilada. Los gels lavados se cubren con un papel filtro y se secan a 37°C.

La presencia del inhibidor de la proteinasa se detecta por la presencia de unas manchas azules de tinta, caseína que no se digiere, lo cual no se ve en el blanco el cual no contiene caseína en el agar; es decir, hay un aumento en la superficie que ocupa la mancha de las muestras que sí contienen inhibidor.

La concentración de la solución de la proteinasa en la cual se remojan las tiras de papel filtro se seleccionó del modo siguiente:

se prepararon soluciones de enzima con diferentes concentraciones, en un rango de 150 a 750 microgramos/ml. Tiras pequeñas de papel, 0.5 x 2.5 cm, se empaparon en cada solución y se dejaron sobre las placas de agar con caseína. Después de 1 hora de incubación a 37°C en una cámara húmeda se quitaron las tiras y el gel se tiñó y destiñó como se mencionó anteriormente. La concentración más baja de la enzima a la cual se digiere la caseína es la que se seleccionó para usarse posteriormente, en este caso fue de 500 microgramos/ml.

RESULTADOS Y DISCUSION

Determinación de la Concentración de Proteína extraída con el buffer veronal.

Esta determinación se realizó con el objeto de observar si el tamaño o la intensidad del halo de inhibición, dependía o estaba relacionado de alguna manera con la concentración de proteína que había en el extracto.

Los resultados obtenidos se encuentran en el cuadro No. 2.

Si el tamaño y la intensidad del halo o zona de inhibición dependiera de la concentración debería esperarse que los halos del frijol patashete, del frijol de soya, de la maguacata y del palo fierro, que son los que mayor concentración de proteína tienen, fueran los más grandes. Observando las figuras de estas muestras puede verse que esto no sucede.

La zona de inhibición del frijol patashete, al cual se le determinó la mayor concentración de proteína, es de las más grandes y claras que se obtiene, pero comparandola con la del frijol del monte que tiene una concentración intermedia, y con la eritrina, la cual tiene una concentración más bien baja, entonces debería esperarse que la zona de inhibición fuera más grande y más intensa.

El frijol de soya, a pesar de tener una concentración

de proteína alta, en comparación con las demás muestras no presenta un halo de inhibición tan claro como se esperaba.

Igualmente ocurre con la maguacata y el palo fierro, cuyas zonas de inhibición también son pequeñas si se relaciona con su concentración de proteína y si se comparan con los halos obtenidos con el frijol escumite, con el guamuchil, con el frijol colorín y con el jinicuil, los cuales son más grandes e intensos a pesar de que la concentración de proteína es menor.

Determinación de Inhibidores de Tripsina por el Método Colorimétrico.

Esta determinación se realizó con el fin de ver si el tamaño y la intensidad de la zona de inhibición dependían de la cantidad de inhibidores de tripsina que se determinan en una muestra colorimetricamente.

Los resultados obtenidos pueden observarse en el cuadro No. 2.

Si el tamaño y la intensidad de la zona de inhibición dependieran de la cantidad de inhibidores de tripsina presentes, debería esperarse que los halos de la maguacata, del palo fierro y de la soya fueran los más grandes.

Observando nuevamente las figuras de las muestras se puede ver que eso no ocurre.

Puede verse que los halos de inhibición más grandes corresponden al frijol patashete, al frijol del monte y a la eritrina y sus concentraciones en inhibidores son menores que los de la maguacata, palo fierro y soya.

En el caso del guamuchil, debería esperarse un halo muy pequeño o casi no haber halo, pero observando su figura se ve que sí aparece este halo de inhibición.

En la lenteja, que es una muestra que se considera que no tiene inhibidores de tripsina, no se forma ninguna zona de inhibición. Puede apreciarse en la figura de esta muestra, que el tamaño y la intensidad de esta mancha que

se debe a las proteínas, disminuye. Esto implica que la tripsina digiere a la caseína que forma parte del agar y tal vez a una parte de las proteínas solubles de la lenteja.

De esto podría concluirse que no puede tomarse como medida de la concentración de inhibidores de tripsina el tamaño del halo y es posible que la forma y tamaño sea debido a la estructura de la proteína, la cual es diferente en cada muestra.

Sin embargo, Jaffé y col. (27), proponen este método para determinar la homogeneidad de lotes de frijoles de la misma especie, puesto que ellos encontraron que en frijoles genéticamente seleccionados sí se puede realizar una diferenciación cualitativa y cuantitativa en cuanto a inhibidores de tripsina, es decir, la intensidad y el tamaño de los halos si es proporcional a la concentración de inhibidores, aunque también se encuentran diferencias dependiendo del método que se use para extraer las proteínas.

CUADRO NO. 2

CONCENTRACION DE PROTEINA EXTRAIDA (METODO DE LOWRY)
Y CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA POR METODO
COLORIMETRICO.

	Proteína extraída mg/ml	Inhibidores de tripsina UTI/mg
Eritrina	17.41	74.95
Frijol colorín	17.48	12.82
Frijol del monte	28.36	25.60
Frijol escumite	14.61	14.28
Frijol patashete	40.69	21.48
Frijol de soya	37.03	200.00
Guaje morado	14.53	24.86
Guaje verde	18.51	18.79
Guamuchil	15.58	4.52
Jinicuil	19.48	49.58
Lenteja	17.48	2.22
Maguacata	34.80	240.00
Palo Fierro	31.52	204.80

Determinación de Inhibidores de tripsina por Micro-electroforesis.

La presencia de estos inhibidores se comprobó por la formación de un halo o zona de inhibición que se presenta cuando la muestra contiene tal inhibidor.

Esta zona de inhibición se observa como una sombra que rodea a la mancha que se obtiene por las proteínas del extracto. Esto se puede observar en las figuras 7 a 20.

Para poder observar las características del halo, como son: forma, posición y tamaño de cada muestra, se corrió al mismo tiempo un blanco de agar que no contiene caseína. En este blanco solo se observa la mancha que se obtiene por las proteínas solubles de cada muestra.

En las muestras que si tienen inhibidor, se observa este halo, es decir, hay un aumento en la superficie de la mancha de la proteína.

En el caso de la lenteja (Fig. No.18) no se observa tal zona de inhibición. Debería esperarse que además de que no se formara el halo de inhibición, la mancha debida a las proteínas desapareciera, o sea, que la tripsina digiere a la caseína que forma parte del agar y también a las proteínas extraídas de la lenteja. Sin embargo no se forma ningun halo, pero la mancha de la proteína no desaparece.

Para asegurar que cuando hay inhibidores de tripsina se debe formar el halo de inhibición, es decir, debe apa-

recer la sombra que rodea a las proteínas, se corrió una muestra que solo es una proteína pura, en este caso se trabajó con albúmina.

A esta proteína se le dió el mismo tratamiento que a los extractos de las muestras, la concentración de proteína que se le determinó fue de 24 mg/ml.

Al observar las placas obtenidas de esa muestra (Fig. No. 21) se puede apreciar que no hay formación del halo, pero la mancha de la proteína no desaparece totalmente. Esto se puede deber, tal vez, a que el tiempo para que la tripsina actúe (1 hora) no sea suficiente para que además de que digiera a la caseína que forma parte del agar digiera a las proteínas del extracto, que en este caso se trata solamente de la albúmina. También puede suceder que la concentración de la tripsina (500 microgramos/ml) no sea suficiente para digerir a las proteínas del extracto, que en este caso se encuentran en una concentración de 24 mg/ml.

Con este ejemplo puede asegurarse que la lenteja no tiene inhibidores de tripsina, o los tiene en tan poca cantidad que por este método no es posible detectarlos.

Observando las figuras de las muestras, puede verse que todas las proteínas de las diferentes semillas presentan una movilidad electroforética diferente.

La mancha de las proteínas extraídas de cada muestra presentan una forma y tamaño diferentes, al igual que los halos de inhibición.

El tamaño del halo es diferente y como ya se mencionó no depende ni de la concentración de proteína, ni de la concentración del inhibidor.

La posición del halo también varía, puede estar en un extremo de la mancha debida a las proteínas, como en el caso del patashete, o puede estar rodeando a ésta, como sucede en el caso de la maguacata.

Dos de las muestras estudiadas, tuvieron un comportamiento especial con resultados difíciles de explicar.

Las muestras e guajes, verde y morado, que tenían alto contenido de proteína no mostraron la mancha colorida al ser teñidos, para demostrar la presencia de proteína total, dando una placa incolora. Esto mismo se repitió todas las veces que se hizo la determinación. Se pensó que podría ser que las proteínas no fueran solubles en solución salina, aunque esto sería raro. Sin embargo, cuando se determinó en el extracto el contenido de proteína, éste era de 16 mg/ml, cantidad suficiente para dar una zona de coloración. La segunda explicación que se dió fue que las proteínas corrieran muy rápido y que la muestra se saliera de la placa. Para aclarar lo anterior se realizó la corrida a diferentes tiempos: 10, 30 y 60 minutos. Los resultados obtenidos fueron los mismos. La única explicación que podría darse entonces es que la proteína no hubiera corrido de su punto de partida. Hay que hacer notar que el extracto salino de los guajes fue de consistencia gelatinosa, distinto













a los demás y que al teñir la placa quedaba solamente colorida la zona de aplicación. Por el método colorimétrico se ve que tiene bajo contenido de inhibidor pero que otras muestras como el escumite y la eritrina, que tienen concentraciones semejantes, sí desarrollaron el halo de inhibición.













El guamuchil fue la leguminosa con más bajo contenido en inhibidores y que dió de manera clara el halo de inhibición. Esto viene a confirmar que los inhibidores son diferentes en las leguminosas en cuanto a sus estructuras, peso molecular y por consiguiente a su movilidad electroforética.

Con el fin de averiguar si en el material cocido desaparecen los inhibidores de tripsina, se cocieron 5 muestras en autoclave durante 20 minutos a 121°C. Se pudo observar que en cuatro de ellas: maguacata, soya, palo fierro y frijol del monte se destruyó por completo el efecto inhibitorio, no apareciendo el halo correspondiente. Sin embargo, el escumite después de cocido continuó mostrando el halo de inhibición, esto va de acuerdo con los resultados obtenidos por el método colorimétrico en el que se determinan 8.37 UTI/mg a esta muestra ya cocida.

A continuación se muestran esquemáticamente los electroforetogramas de las muestras empleadas en los cuales se señala el halo de inhibición y más adelante se encuentran las fotografías de los mismos.

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS ELECTROFORETOGRAMAS

MUESTRA	UTI*	BLANCO	MUESTRA CON INHIBIDOR
Eritrina	74.95		
Frijol colorín	12.82		
Frijol del monte	25.60		
Frijol escumite	14.28		
Frijol escumite cocido	8.37		
Frijol patashete	21.48		

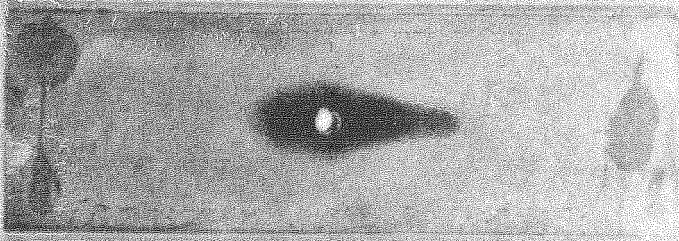
Frijol de soya	200.0		
Guamuchil	4.52		
Jinicuil	49.58		
Lenteja	2.22		
Maguacata	240.00		
Palo fierro	204.80		

* 1 UT = 0.01 unidades de D.O.

* UTI = $\frac{(D.O. \text{ de } 40 \text{ g} - D.O. \text{ problema})}{0.020}$

Fig. No. 7

ERITRINA

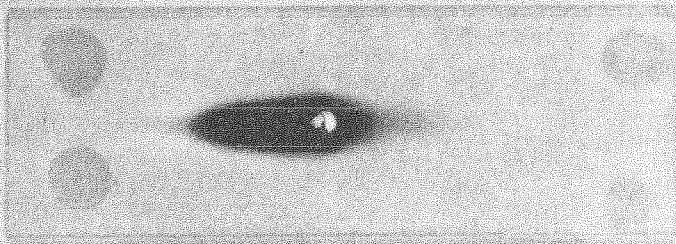


BLANCO



Fig No. 8

FR I J O L
C O L O R I N



B L A N C O

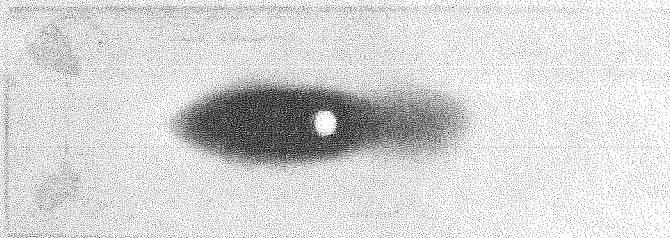
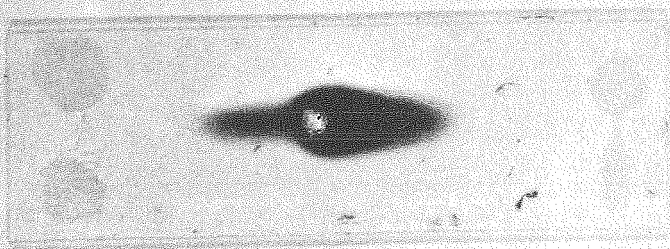


Fig. No.9

FRIJOL DEL
MONTE



BLANCO

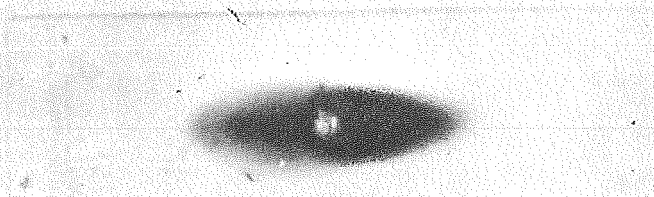
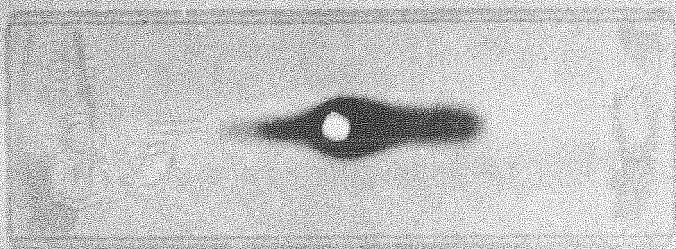


Fig. No.10

ESCUMITE



BLANCO

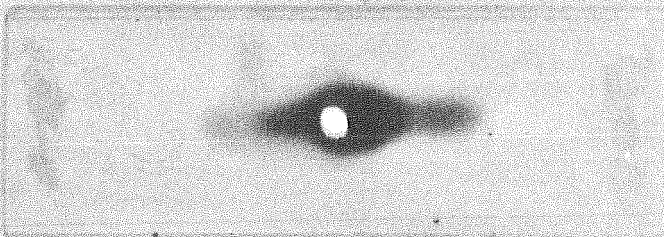
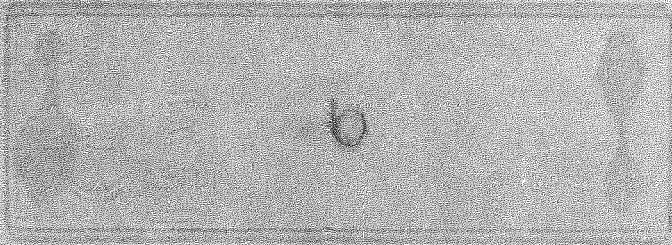


Fig. No.11

ESCUMITE
COCIDO



BL ANCO

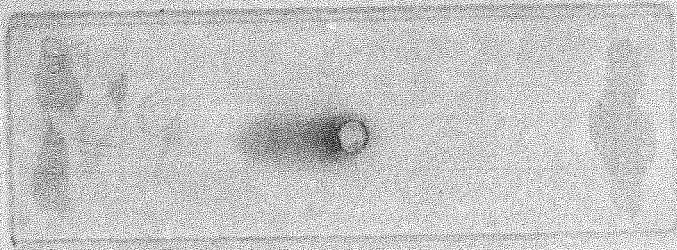
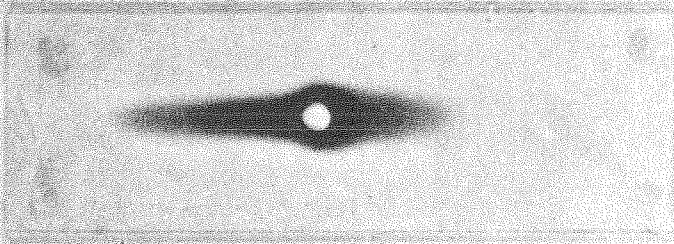


Fig. No.12

PATASHETE



BLANCO

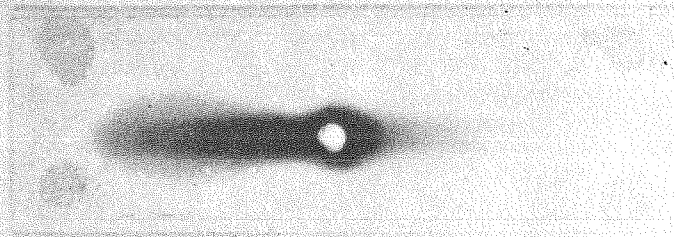
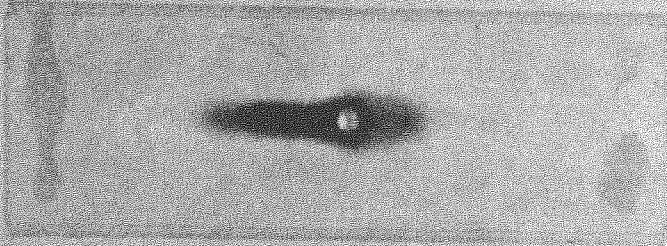
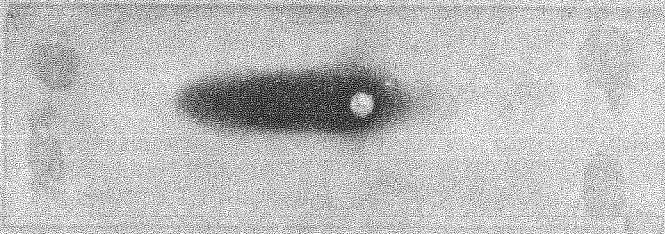


Fig. No.13

SOYA



BL ANCO



GUAJE MORADO



BLANCO

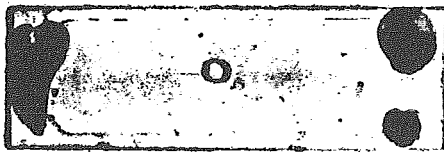


Fig. No.14

GUAJE VERDE



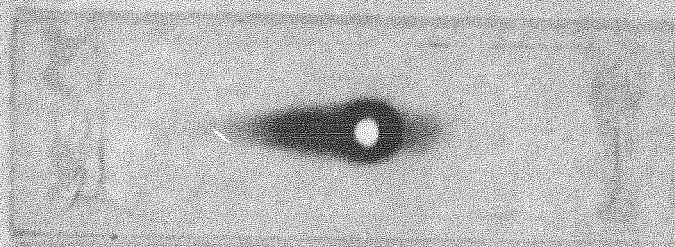
BLANCO



Fig. No.15

Fig. No.16

GUAMUCHIL



BLANCO

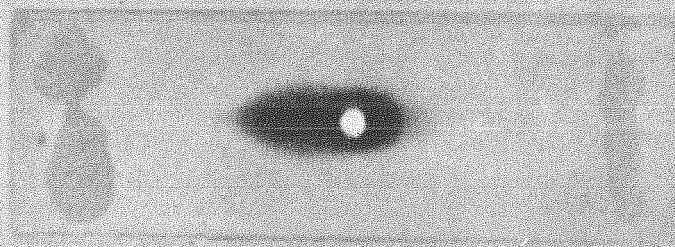
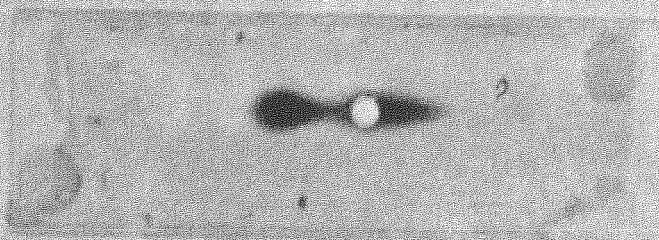


Fig. No 17

J I N I C U I L



B L A N C O

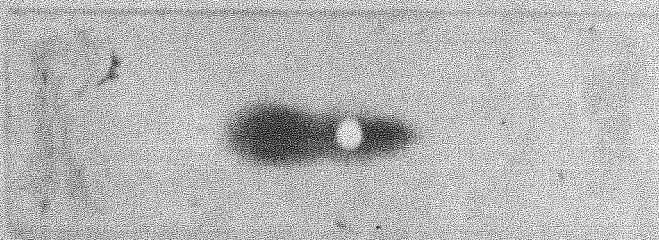
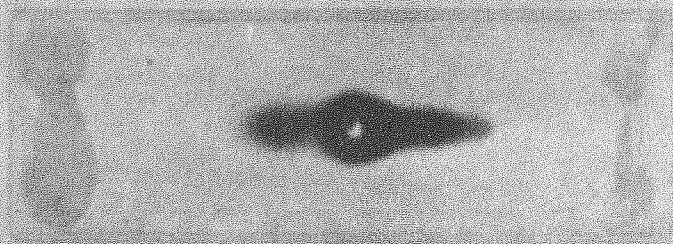


Fig. No. 18

LENTEJA



BLANCO

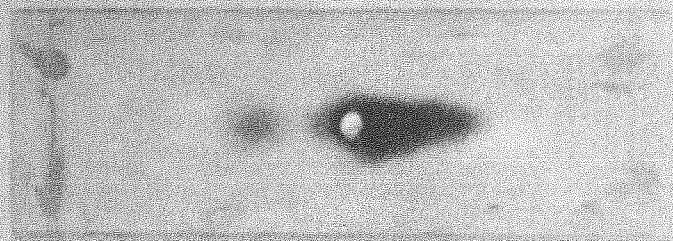
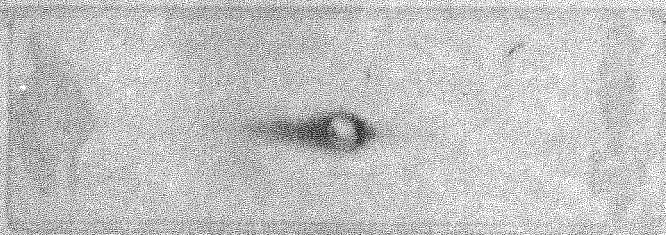


Fig. No.19

MAGUACATA



BLANCO

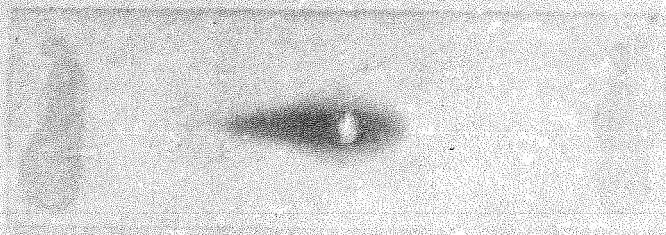
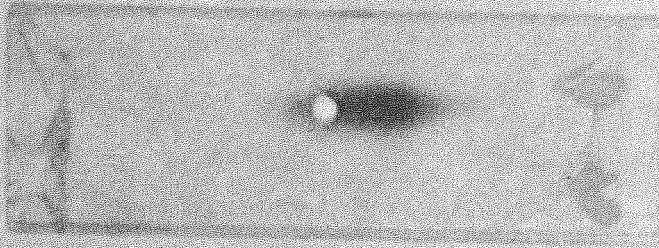


Fig. No 20

PALO FIERRO



BLANCO

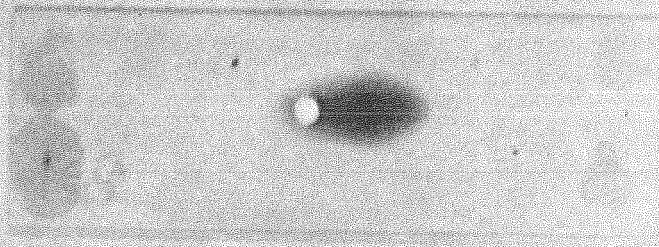
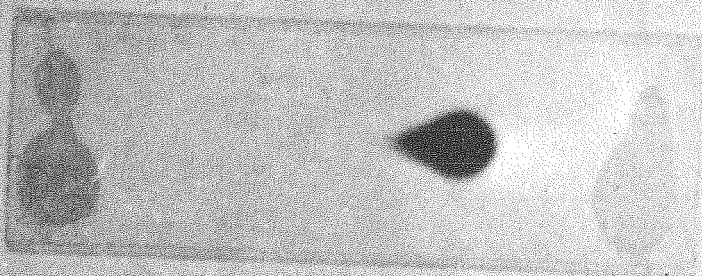
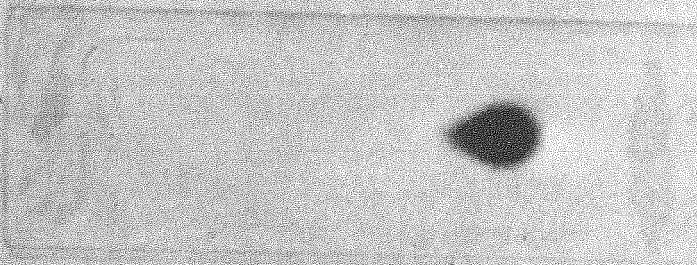


Fig. No. 21

ALBUMINA



BLANCO



C O N C L U S I O N E S

De los resultados obtenidos en este trabajo, se puede decir que el tamaño y la forma de los halos de inhibición son independientes de la concentración de proteína extraída y de la concentración de inhibidores de tripsina. Estas características son exclusivas de cada especie y variedad de las leguminosas.

Este método resulta de utilidad para detectar presencia de inhibidores de proteasas en forma rápida y sencilla en diversas muestras como primer paso y posteriormente realizar el método cuantitativo con el material seleccionado.

Otra utilidad de este método es que puede ser empleado para conocer la homogeneidad en semillas de leguminosas.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Liener, Irvin E., "Toxic Constituents of Plants Foodstuffs". Academic Press. New York, 1969.
- 2.- Liener, I. E., "Significance for Humans Of Biologically Active Factors in Soybeans and Other Food Legumes". J. Am. Oil Chem. Soc. 56, 3: 121-129, 1979.
- 3.- Srikantia, S. G., "Use of the Legumes on Green Leafy Vegetables in Feeding Infants and Young Children". Protein Advisory Group of United Nations Systems. New York 1972. C: 1227-1245.
- 4.- Uvalle, B. A., "Evaluación Nutricional de 7 Frijoles Comestibles del Estado de Chiapas". Tesis 1978.
- 5.- Derrick, B., Jelliffe y Jelliffe, E. F. "The Role of Legumes and DGLV in Domestic Multimixes for the Transitional". Protein Advisory Group of United Nations Systems. New York, 1972. C: 1269.
- 6.- Worthington, R. E., Beuchat, L. R., " -Galactosidase Activity of Fungi of Intestinal Gas-Forming Peanut Oligosaccharides". J. Agr. Food Chem. 22, 6: 1063-1065, 1974.



- 7.- Tanaka, M., Thananunkul, D., Ching Lee T., Chichester, C.O.
 "A Amplified Method For the Quantitative Determination
 of Sucrose, Raffinose and Stachyose in Legume Seeds".
 J. Food Sci. 40; 1087-1088, 1975.
- 8.- "Importance of Food Legumes". Protein Advisory Group of
 United Nations Systems. New York, 1972. D: 139.
- 9.- Lehninger, L. A., "Bioquímica". Ed. Omega S.A. Barcelona
 1972.
- 10.- Learmonth, E. M. "The Influence of Soya Flour on Bread
 Doughs.III. The Distribution of the Papain-inhibiting
 Factor in Soya-beans". J. Sci. Food Agric. 9:269, 1958.
- 11.- Jaffé, W. G., "Factores Tóxicos en Leguminosas". Arch.
 Latinoam. de Nutr. 18: 205-218, 1968.
- 12.- Bowman, D.E., "Amylase Inhibitor of Navy Beans". Scien-
 ce 102: 358, 1945.
- 13.- Marshall, J. J., Lauda C. M., "Purification and Proper-
 ties of Phaseolamin, an Inhibitor of α -Amylase from the
 Kidney Bean, Phaseolus vulgaris". J. Biol. Chem. 250,
 20: 8030-8037, 1975.
- 14.- Pressey, R., "Separation & Properties of Potato Invertase
 and Invertase Inhibitor". Arch. Biochem. Biophys. 113;
 667-674, 1966.

- 15.- Seidl, D. S., Abreu H., Jaffé, W. G., "Purification of Subtilisin Inhibitor from Black Bean Seeds". FEBS Lett. 92: 245-250, 1978.
- 16.- Jaffé, W. G., Seidl Callejas, A., González, E., "Subtilisin Inhibitor Activity in Legume Seeds". J. Agric. Food Chem. 27, 4: 912-913, 1979.
- 17.- Liener, I. E., "Effects of Anti-Nutritional and Toxic Factors on the Quality and Utilization of Legume Proteins". Quality Factors Plant Breeding Composition Processing and Antinutrients. Ed. Mendel Friedman, Inc. New York, 1975.
- 18.- Gertler, A., Birk, Y., Bondi, A., "A Comparative Study of the Nutritional and Physiological Significance of Pure Soybean Meal in Chicks and Rats". J. Nutr. 91: 358-370, 1967.
- 19.- Tseng Yen, J., Jensen, A. H., Simon J., "Effect of Dietary Raw Soybean and Soybean Trypsin Inhibitor on Trypsin and Chymotrypsin Activities in the Pancreas and in Small Intestinal Juice of Growing Swine". J. Nutr. 107: 156-165, 1977.
- 20.- Kwong, E., Barnes, R. H., "Effect of Soybean Trypsin Inhibitor on Methionine and Cystine Utilization". J. Nutr. 81: 392-398, 1963.

- 21.- Liener, I. E., Huang, J. S., "Interaction of the Kunitz Soybean Trypsin with Bovine Trypsin. Evidence for an Acyl-Enzyme Intermediate During Complexation". Biochem. 16, 11: 2474-2478, 1977.
- 22.- Blow, D. M., Janin, J., Sweet, R. M., "Mode of Action of Soybean Trypsin Inhibitor (Kunitz) as a Model for Specific Protein-Protein Interactions". Nature 249, 3: 54-57, 1974.
- 23.- Wange, H. L., Swain, E. W., Wallen, L. L., Hesseltine, C. W., "Free Fatty Acids Identified as Antitryptic Factor in Soybean Fermented by Rhizopus oligosporus. J. Nutr. 105: 1351-1355, 1975.
- 24.- Conn, E. E., Stumpf, P. K., "Outlines of Biochemistry". Willey Int. 3a. Ed. 1972.
- 25.- Hartree, E. F., "Determination of Protein: a Modification of the Lowry Method that Gives a Linear Photometric Response". Anal. Biochem. 48: 422-427, 1972.
- 26.- Kakade, M. L., Liener, I. E., "An Evaluation of Natural & Synthetic Substrates for Measuring the Antitryptic Activity of Soybean Sample". Cereal Chem. 46: 518-526, 1969.
- 27.- Seidl, D. S., Jaffé, W. G., González, E., Callejas, A., "A Microelectrophoretic Method for the Detection of Proteinase Inhibitors". Anal. Biochem. 88, 417, 1978.

28.- Jaffé, W. G., "Limiting Essential Amino Acids of Some Seeds". Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 71: 398-399, 1949.

29.- Harol A, Harper' "Manual de Química Fisiológica".

4a. Ed. Manual Moderno. México, D.F. 1975.