

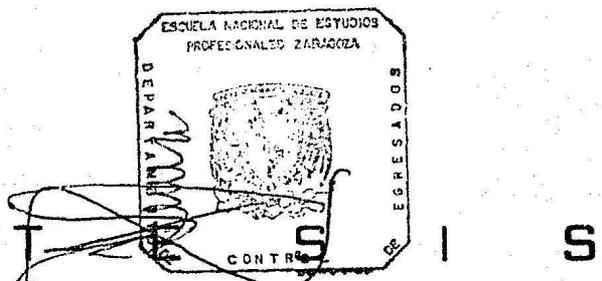
11  
22j



# Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza

## Aislamiento y Parcial Caracterización de las Principales Proteínas de Semillas de Frijol de las Especies Phaseolus vulgaris L., Phaseolus acutifolius y Phaseolus coccineus



Que para obtener el título de:  
b i ó l o g o  
p r e s e n t a :  
MARIA DEL PILAR INTRIAGO ORTEGA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## C O N T E N I D O

1.0	INTRODUCCION . . . . .	1
2.0	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS . . . . .	3
3.0	OBJETIVOS . . . . .	7
3.1	Objetivo General . . . . .	7
3.2	Objetivos Operacionales . . . . .	7
4.0	MATERIAL Y METODOS . . . . .	8
4.1	Variedades estudiadas . . . . .	8
4.2	Extracción de lípidos y proteínas. . . . .	16
4.2.1	Extracción de lípidos. . . . .	16
4.2.2	Extracción de proteínas en - presencia de un inhibidor de- proteasas. . . . .	17
4.2.3	Extracción de proteínas. . . . .	18
4.2.4	Extracción de Globulina 1 (G1). . . . .	18
4.2.5	Extracción de Globulina 2 (G2). . . . .	20
4.3	Determinación de Proteínas. . . . .	22
4.4	Electroforesis analítica . . . . .	26
4.4.1	Tinción de proteínas con azul brillante de Coomassie R-250. . . . .	33
4.4.2	Tinción de glucoproteínas con azul alciano. . . . .	33
4.4.3	Tinción de proteínas con gru- pos sulfhidrilos. . . . .	34
4.5	Análisis Densitométrico. . . . .	35
4.5.1	Dehidratación de geles . . . . .	35
4.5.2	Densitometría . . . . .	36

4.6	Estimación de pesos moleculares. . . . .	36
4.7	Hidrólisis de proteínas. . . . .	37
4.7.1	Medición de las actividades de las enzimas pepsina y -- tripsina. . . . .	39
4.7.2	Análisis electroforético de las proteínas de frijol desnaturalizadas. . . . .	41
4.7.3	Hidrólisis de las proteínas-desnaturalizadas. . . . .	44
4.8	Cromatografía de exclusión molecular. . . . .	47
4.8.1	Preparación del Ultrogel. . . . .	47
4.8.2	Preparación de la columna. . . . .	48
4.8.3	Empaque de la columna. . . . .	48
4.8.4	Equilibrio del Ultrogel . . . . .	49
4.8.5	Introducción de la muestra . . . . .	49
4.8.6	Elución de la muestra. . . . .	50
5.0	RESULTADOS . . . . .	51
6.0	DISCUSION Y CONCLUSIONES . . . . .	108
7.0	BIBLIOGRAFIA. . . . .	114

## C O N T E N I D O

1.0	INTRODUCCION . . . . .	1
2.0	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS . . . . .	3
3.0	OBJETIVOS . . . . .	7
3.1	Objetivo General . . . . .	7
3.2	Objetivos Operacionales . . . . .	7
4.0	MATERIAL Y METODOS . . . . .	8
4.1	Variedades estudiadas . . . . .	8
4.2	Extracción de lípidos y proteínas. . . . .	16
4.2.1	Extracción de lípidos. . . . .	16
4.2.2	Extracción de proteínas en - presencia de un inhibidor de- proteasas. . . . .	17
4.2.3	Extracción de proteínas. . . . .	18
4.2.4	Extracción de Globulina 1 (G1). . . . .	18
4.2.5	Extracción de Globulina 2 (G2). . . . .	20
4.3	Determinación de Proteínas. . . . .	22
4.4	Electroforesis analítica . . . . .	26
4.4.1	Tinción de proteínas con azul brillante de Coomassie R-250... . . . .	33
4.4.2	Tinción de glucoproteínas con azul alciano. . . . .	33
4.4.3	Tinción de proteínas con gru- pos sulfhidrilos. . . . .	34
4.5	Análisis Densitométrico. . . . .	35
4.5.1	Deshidratación de geles . . . . .	35
4.5.2	Densitometría . . . . .	36

4.6	Estimación de pesos moleculares. . . . .	36
4.7	Hidrólisis de proteínas. . . . .	37
4.7.1	Medición de las actividades de las enzimas pepsina y -- tripsina. . . . .	39
4.7.2	Análisis electroforético de las proteínas de frijol desnaturalizadas. . . . .	41
4.7.3	Hidrólisis de las proteínas-desnaturalizadas. . . . .	44
4.8	Cromatografía de exclusión molecular. . . . .	47
4.8.1	Preparación del Ultrogel. . . . .	47
4.8.2	Preparación de la columna. . . . .	48
4.8.3	Empaque de la columna. . . . .	48
4.8.4	Equilibrio del Ultrogel . . . . .	49
4.8.5	Introducción de la muestra . . . . .	49
4.8.6	Elución de la muestra. . . . .	50
5.0	RESULTADOS . . . . .	51
6.0	DISCUSION Y CONCLUSIONES . . . . .	108
7.0	BIBLIOGRAFIA. . . . .	114

## R E S U M E N

Por medio de la caracterización electroforética realizada en geles de poliacrilamida -SDS y teñidos para: -- proteínas en general, proteínas con grupos sulfhidrilos y glucoproteínas, se demostró que en cada especie de frijol estudiada las proteínas extraídas son muy similares, exhibiendo marcadas diferencias cuando se comparó una especie con las otras.

Las proteínas nativas y desnaturalizadas mostraron - alta resistencia a ser hidrolizadas por las enzimas tripsina y pepsina, resultado de alta significancia nutricional, porque las proteínas más abundantes de las semillas estudiadas no podrán ser aprovechables.

El estudio de las proteínas más abundantes en las -- semillas de frijol, que son las globulinas de reserva, -- arrojó información importante sobre algunas de sus características como es su solubilidad, peso molecular, etc.

El método desarrollado para la purificación de las - globulinas G1 y G2, permitirá realizar con estas una gran cantidad de estudios tales como: Determinar la contribución de estas en las propiedades de la semilla, determinar su participación en la germinación, utilizarlas como marcadores taxonómicos, etc.

## R E S U M E N

Por medio de la caracterización electroforética realizada en geles de poliacrilamida -SDS y teñidos para: -- proteínas en general, proteínas con grupos sulfhidrilos y glucoproteínas, se demostró que en cada especie de frijol estudiada las proteínas extraídas son muy similares, exhibiendo marcadas diferencias cuando se comparó una especie con las otras.

Las proteínas nativas y desnaturalizadas mostraron -- alta resistencia a ser hidrolizadas por las enzimas tripsina y pepsina, resultado de alta significancia nutricional, porque las proteínas más abundantes de las semillas estudiadas no podrán ser aprovechables.

El estudio de las proteínas más abundantes en las -- semillas de frijol, que son las globulinas de reserva, -- arrojó información importante sobre algunas de sus características como es su solubilidad, peso molecular, etc.

El método desarrollado para la purificación de las -- globulinas G1 y G2, permitirá realizar con estas una gran cantidad de estudios tales como: Determinar la contribución de estas en las propiedades de la semilla, determinar su participación en la germinación, utilizarlas como marcadores taxonómicos, etc.

## 1.0 INTRODUCCION.

La alimentación se encuentra entre los principales problemas que en la actualidad aquejan a la población de bastas áreas del mundo. Las condiciones existentes son muy diferentes entre las regiones del mundo, por una parte; en los países altamente industrializados o desarrollados, donde vive apenas una tercera parte de la población mundial, se produce alimentos en gran cantidad, hasta para exportar, y por otra parte, en los países en desarrollo que cuentan con más de las dos terceras partes de la población y de tierra, nos encontramos con una crítica deficiencia en la producción de alimentos.

En la actualidad aproximadamente el 29% de la proteína que se consume en el mundo es de origen animal, el resto es principalmente de origen vegetal (1). Hecho que resalta la importancia de las proteínas de origen vegetal en la alimentación humana mundial.

En los países en desarrollo, los granos de leguminosa son la principal fuente de proteínas y para la mayoría de estos países, un aumento en la producción y consumo de leguminosas representa una solución parcial pero rápida al creciente problema alimentario.

Las leguminosas han sido uno de los primeros cultivos comestibles practicados por el hombre. En América del Norte, Central y del Sur, el frijol ha sido una de las leguminosas que se ha cultivado desde tiempos remotos, y el gran número de nombres que le dan los indios americanos, y la gran cantidad de variedades cultivadas, son una prueba de su antigüedad (2).

El estado de Durango es el segundo productor de frijol a nivel nacional, se siembra anualmente un promedio - de 305.728 hectáreas de las cuales el 94% son de temporal. Con una producción de 155,590 toneladas y un rendimiento de 485 Kg/hectárea en tierras de temporal y de 1,000 Kg/hectárea en tierras de riego (3). Situación que obliga a la constante búsqueda de variedades mejoradas, que mejor adaptadas a las condiciones semidesérticas de la región, proporcionen una mayor producción.

El propósito de este trabajo es estudiar las proteínas más abundantes en algunas semillas mejoradas de frijol, para apoyar los estudios agronómicos sobre estas nuevas variedades y contribuir en el conocimiento del alimento de mayor consumo en México.

## 2.0 ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Las proteínas presentes en semillas de Leguminosas son de dos tipos:

- a) Proteínas metabólicas: Dentro de éstas se agrupan las proteínas estructurales y las enzimas.
- b) Proteínas de reserva: Estas se encuentran localizadas en los cuerpos proteicos, que también han sido llamados granos de aleurona. Estas proteínas son sintetizadas durante el desarrollo de la semilla (4). Las principales proteínas de reserva de las leguminosas son del tipo de las globulinas porque requieren para su solubilización de la presencia de sales.

Una semilla madura y seca de frijol de aproximadamente 450 mg. de peso, contiene de un 20% a un 30% de su peso (90-145 mg) de proteínas y el 50 a 75% del total de sus proteínas está dado por las de reserva (5). Por su relativa abundancia las proteínas de reserva son consideradas como las proteínas de mayor importancia fisiológica y nutricional.

Se ha demostrado que las proteínas de reserva están restringidas a las semillas, Miller (6), examinó inmunoelectroforéticamente las proteínas extraídas de diferentes órganos de la planta Pisum sativum y solamente las detectó en los extractos de las siguientes partes de la semilla: cotiledones, epicótilo, hipocótilo más radícula.

Osborne (7) estudió las proteínas de reserva de ---

Vicia sp y Phaseolus sativum encontrando dos globulinas - de mayor importancia, las cuales llamó "legumina" con un coeficiente de sedimentación de 11S y "vicilina" con un coeficiente de sedimentación de 7S. Danielson (8) caracterizó dos globulinas de semillas de Phaseolus sativum y -- sus resultados fueron similares a los de Osborne.

Ericson y Chrispeels (9) aislaron y purificaron dos proteínas de reserva de Phaseolus aureus con coeficientes de sedimentación de 8S y 11.3S respectivamente. La proteína 11.3S mostró tres subunidades con pesos moleculares de 50,000, 44,000 y 16,500 daltones respectivamente, conteniendo cerca del 1% de glucosamina. La proteína 8S, la -- cual no contenía cisteína, con cuatro subunidades con pesos moleculares de 63,500, 60,000, 29,500 y 24,000 daltones, conteniendo 0.2% de glucosamina y 1% de manosa. Esta proteína 8S corresponde a la glucoproteína II descrita -- por Pusztai y Watt (10) que constituye el 35% del total de proteína de la semilla de Phaseolus vulgaris y esta -- compuesta por cuatro subunidades.

Hill y Brendinbach (11) caracterizaron las proteínas de reserva de semillas de frijol de soya, obteniendo tres distintas fracciones cuyos coeficientes de sedimentación fueron 2.2S, 7.5S y 11.8S respectivamente.

Blagrove y Gillespie (12) encontraron que las proteínas de reserva de Lupinus angustifolius eran dos globulinas y las llamaron conglutina alfa y conglutina beta, -- correspondiendo a las proteínas 11S y 7-8S descritas por los anteriores trabajos.

Sun y colaboradores (13) estudiaron la acumulación-

de las proteínas de reserva durante el desarrollo de las semillas de frijol, variedad Tendergreen de Phaseolus vulgaris, L y las detectaron hasta los catorce días después de floración, manteniéndose su patrón polipeptídico hasta la completa maduración que fue a los treinta y siete días, observando un incremento de 3.3 mg de proteína/día.

La caracterización de las proteínas de semillas de frijol es un requerimiento fundamental para los estudios básicos y aplicados de las semillas, Sin embargo, se han encontrado considerables dificultades en la obtención de muestras puras de los principales componentes proteicos.- La extracción de las globulinas en un medio salino, acidificado por ácido ascórbico parece ser el más apropiado para semillas de Phaseolus vulgaris, según Sun y Hall (14), quienes compararon cinco métodos de extracción, todos con medios salinos pero con diferentes valores de pH. Estos autores informan que el medio de extracción que les dió mejores resultados fue con NaCl 0.5 M y ácido ascórbico 0.25M.

La purificación de las proteínas de reserva es el paso limitante para su caracterización y merece toda la atención porque con ellas se puede realizar una gran cantidad de estudios, tales como:

- 1.- Determinar su contenido de proteínas, aminoácidos esenciales, azúcares, fibra, digestibilidad, etc., y señalar la contribución de estas en las propiedades de la semilla íntegra.
- 2.- Estudiar su participación en la germinación de la semilla.

- 3.- Estudiar el efecto de distintas condiciones de almacenamiento sobre su composición, estructura, y subsecuentemente sobre la germinación.
- 4.- Establecer la relación de estas globulinas con algunos factores antifisiológicos, como: inhibidores de enzimas, hemoaglutininas, flatulencia, etc.
- 5.- Utilizarlas como marcadores en estudios taxonómicos.
- 6.- Ser un excelente sistema para el estudio de la síntesis de proteínas, porque además de producirse pocas especies moleculares y con períodos bien definidos, - la síntesis es muy activa.

### 3.0 OBJETIVOS

3.1 El objetivo final o general de este trabajo es aislar las principales proteínas de algunas semillas mejoradas del género Phaseolus y caracterizarlas desde un punto de vista bioquímico. Aportando algunos resultados que permitan conjuntamente con los estudios agrónómicos, realizar una evaluación multidisciplinaria de mayor fuerza y confianza que permita recomendar el cultivo de variedades que presenten mayores ventajas para quien la siembra y sobre todo para quien la consume.

#### 3.2 Objetivos operacionales.

3.2.1. Extraer las principales proteínas de cada una de las variedades en estudio. Utilizando las técnicas que se describen en la sección de material y métodos.

3.2.2. Analizar la pureza de las proteínas aisladas, por medio de la electroforesis analítica.

3.2.3. Estimar por electroforesis el peso molecular de las principales proteínas aisladas utilizando como referencia proteínas de peso molecular conocido.

3.2.4. Cuantificar las proteínas aisladas por análisis densitométrico y por métodos químicos.

3.2.5. Estudiar in vitro la digestividad de estas proteínas.

#### 4.0 MATERIAL Y METODOS.

4.1 Las variedades estudiadas en el presente trabajo fueron proporcionadas por el Campo Agrícola Experimental Valle del Guadiana del INIA y son las siguientes:

<u>Phaseolus vulgaris L.</u>	<u>Phaseolus coccineus</u>	<u>Phaseolus acutifolius</u>
Flor de Mayo (testigo)	# 276	Tecuzi 29
Bayo Baranda	# 264	Tecuzi 72
Bayo Rata	# 265	Tecuzi 1-74
Bayo Los Llanos	# 249	Raramuri 26
Bayo Durango	# 222	Raramuri 27
Bayo Madero	# 209	Cuencamé
Bayo Criollo Los Llanos	# 208	P.I. 239056
Ojo de Cabra San Juan del Río	# 203	P.I. 231638
Pinto Nacional	# 60	P.I. 321638
Río Grande	# 27	P.I. 319551

En las figuras 1 a 6 se muestran las principales -- características de estas semillas.

#### Reactivos:

n-Hexano (merck, 4367)

Cloruro de Sodio (Merck, 206404).

Azida de Sodio (Fisher Scientific Company, S-227 78263)

Acido Ascórbico (Merck, 127).

Fenil metil sulfonil fluoruro (Sigma, P-7626)

Dimetil Sulfóxido (Sigma, D-5879)

Carbonato de Sodio (Merck, 206392).

Hidróxido de Sodio y Potasio tetrahidratado (Baker & Adamson 2285).

Sulfato de Cobre (Mallindkrodt, 4844).

Reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu (Sigma, F-9252)  
Albúmina sérica de bovino (Sigma, A-4503).  
Acrilamida (Bio-Rad, 161-0101)  
Bis-acrilamida (Bio-Rad, 161-0201)  
Trizma base (Sigma, T-1503).  
Acido clorhídrico, 37% pureza y 1.19 g/ml (Merck, 317).  
Persulfato de amonio (Bio-Rad, 161-0700).  
TEMED (Bio-Rad, 161-0800)  
Dodecil Sulfato de sodio, SDS (Bio-Rad, 161-0301).  
Glicerol (merck, 4094)  
2-mercaptoetanol (Bio-Rad, 161-0710).  
Azul de bromofenol (Bio-Rad, 161-0404)  
Glicina (Sigma, G-7126).  
Azul brillante de Coomassie R-250 (Bio-Rad, 161-0400)  
Acido tricloroacético (Sigma, T-4885),  
Acido acético glacial (Merck, 62).  
Acido peryódico (Sigma, P-7875).  
Metabisulfito de potasio (Merck, 202027).  
Azul alciano (Bio-Rad 101-0401)  
Metanol (Baker, 9070).  
2-2'-dihidroxi-6,6'-dinaftil disulfuro, DDD, (Sigma, D-8003).  
Fast black K salt (Sigma, F-7553)  
Etilendiaminotetracético sal disódica, EDTA (Mallindcrodt, 4391).  
Mioglobina, 17,200 daltones (Sigma, M-0630).  
Inhibidor de Tripsina, 21,000 daltones (Sigma, T-9003).  
DNAasa I, 34,000 daltones (Sigma, DN-CS, D-1001)  
Albúmina de Huevo, 45,000 daltones (Sigma, A-7642).  
Acido perclórico, 70-72% pureza (Baker, 9652)  
Pepsina (Difco), 0151-15)  
Tripsina (Sigma, T-8003).  
Hemoglobina (Difco, 0136-02).  
Urea (Merck, 8487).

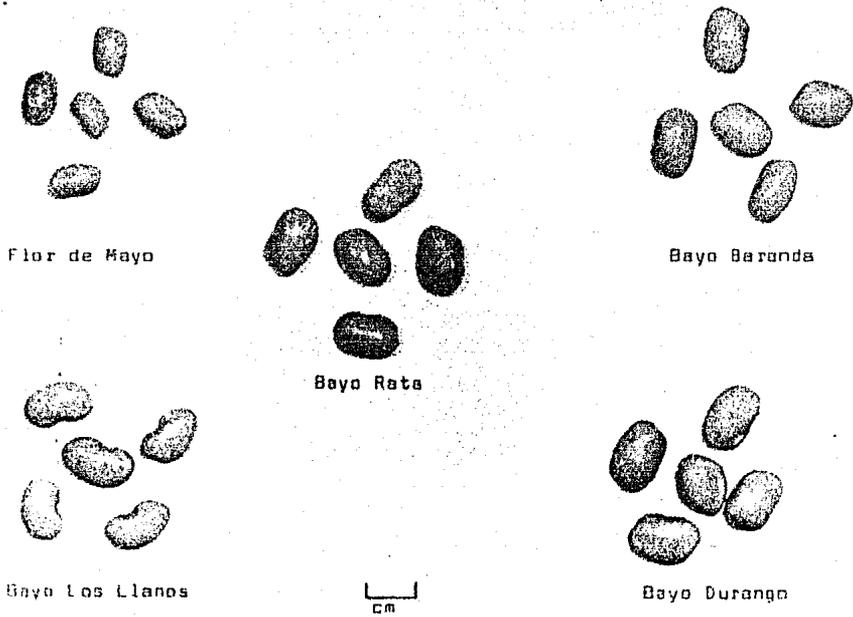


Fig. 1. Semillas de frijol, de la especie Phaseolus vulgaris L.

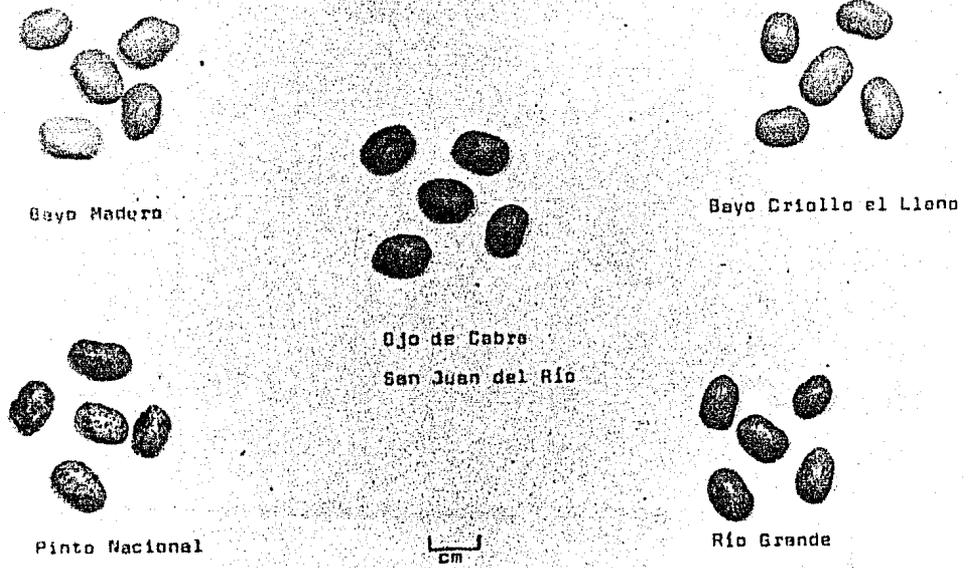


Fig. 2. Semillas de frijol, de la especie Phaseolus --  
vulgaris L.

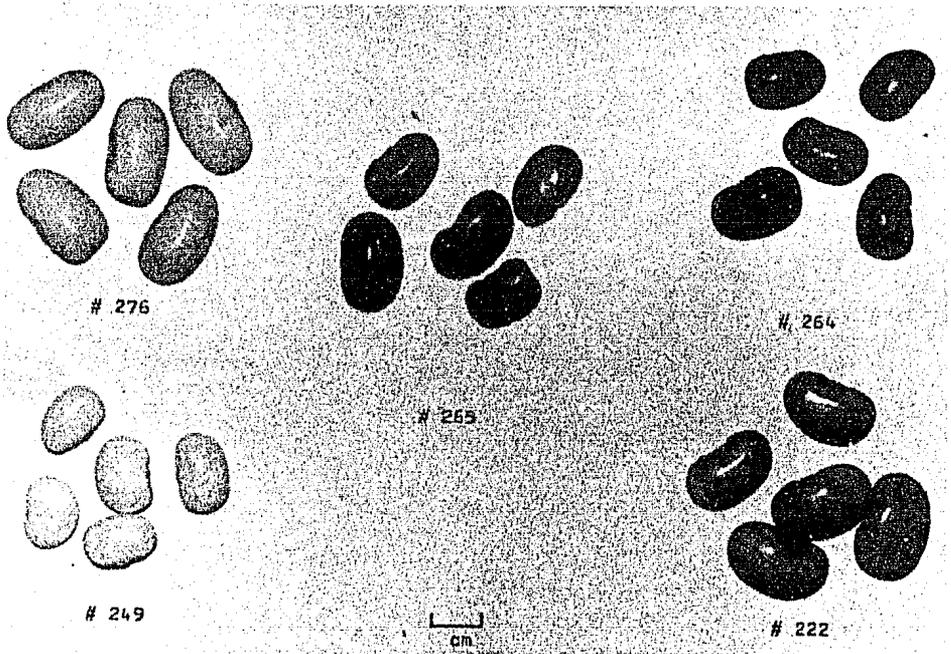


Fig. 3. Semillas de frijol de la especie Phaseolus - -  
coccineus.

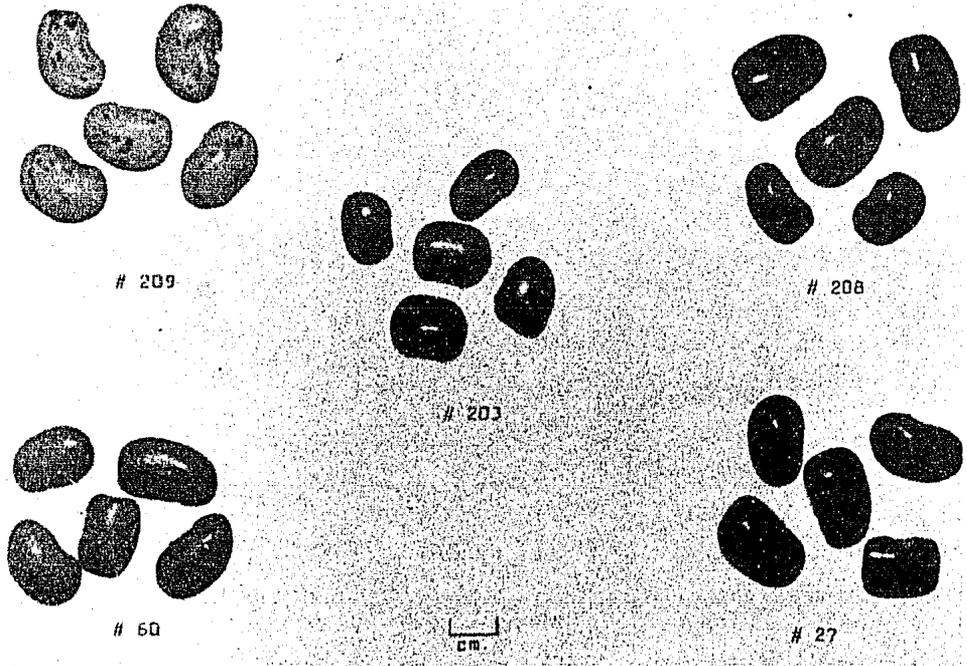
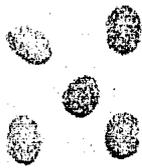


Fig. 4. Semillas de frijol de la especie Phaseolus - - - coccineus.



Tecuzi 29



Tecuzi 72



Tecuzi 1-74



Raramuri 26



Raramuri 27

Fig. 5. Semillas de frijol de la especie Phaseolus - -  
acutifolius.

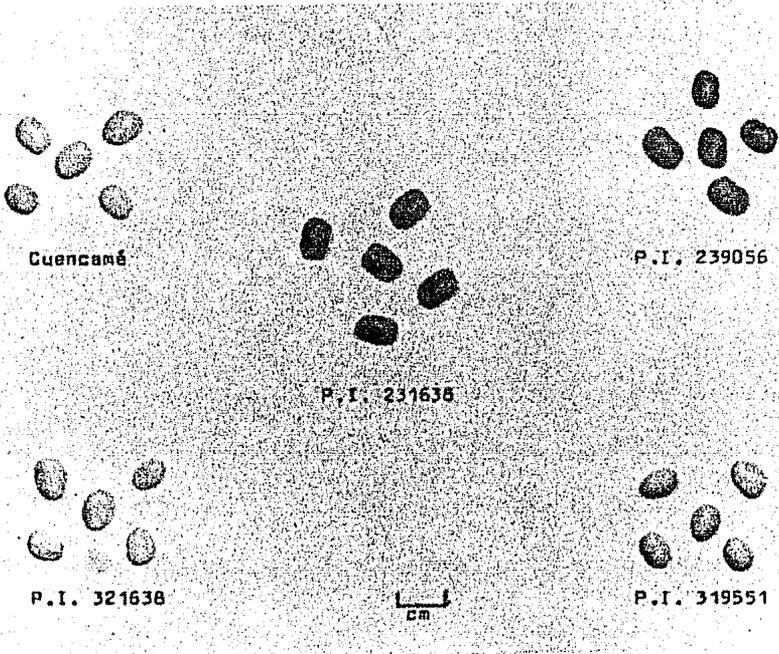


Fig. 6. Semillas de frijol de la especie Phaseolus acutifolius.

Acido bórico (Merck, 165).

Cloruro de calcio (Merck, 2382).

Dextrana azul, P.M. 2,000,000 (Sigma, D-5751).

Ultrogel AcA 34, 20,000-350,000 (LKB 2204-340)

#### 4.3. Extracciones de Lípidos y Proteínas.

##### Soluciones:

- 1.- NaCl 0.5M conteniendo  $\text{NaN}_3$  0.02%. - Se disuelven 29.25 g de NaCl, 0.2 g de  $\text{NaN}_3$  en agua desmineralizada y se llevan a 1000 ml.
- 2.- Fenil metil sulfonil fluoruro 100 mM. - Se pesan - - 0.0174 g de fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) y se disuelven en 1.0 ml de dimetil sulfóxido.
- 3.- Solución de NaCl 0.5M,  $\text{NaN}_3$  0.02% y PMSF 0.1 mM. - Se pesan 14.61 g de NaCl, 0.1 g de  $\text{NaN}_3$ , se disuelven en agua desmineralizada y se les adiciona con agitación 0.5 ml de PMSF 100 mM. Se llevan a un volúmen final - de 500 ml con agua desmineralizada.
- 4.- NaCl 0.5M conteniendo ácido ascórbico 0.25M y  $\text{NaN}_3$  -- 0.02%. - se disuelven 29.25 g de NaCl, 44.03 g de ácido ascórbico, 0.2 g de  $\text{NaN}_3$  con agua desmineralizada y se llevan a 1000 ml.
- 5.- NaCl 0.06M conteniendo ácido ascórbico 0.25M y  $\text{NaN}_3$  - 0.02%. - Se disuelven 3.5 g de NaCl, 44.03 g de ácido ascórbico y 0.2 g de  $\text{NaN}_3$  con agua desmineralizada y se llevan a 1000 ml.

##### 4.3.1. Extracción de Lípidos.

- 1.- Las semillas se muelen en una licuadora comercial hasta obtener un polvo fino. Se tamiza en una malla # 25 y - lo que no pasa se vuelve a moler y se tamiza de nuevo.

- 2.- Pesar 10 g de polvo en un matraz erlenmeyer de 50 ml. se agregan 20 ml de n-hexano frío y se agita durante 30 minutos a 4°C.
- 3.- Dejar que se sedimente la harina, se decanta el n-hexano que contiene los lípidos extraídos.
- 4.- Adicionar el sedimento anterior, 20 ml de n-hexano -- frío, agitar durante 30 minutos a 4°C; dejar sedimentar y decantar el n-hexano.
- 5.- Repetir una vez más el paso anterior.
- 6.- Eliminar el n-hexano por medio de un ventilador o una campana de extracción hasta que no se perciba su olor.
- 7.- La harina libre de lípidos se guarda en pequeños frascos perfectamente etiquetados, en un desecador a vacío -- hasta su utilización.

Este procedimiento se realiza con cada una de las variedades en estudio.

#### 4.3.2. Extracción de proteínas en presencia de un Inhibidor de Proteasas.

- 1.- Se pesan 3.0 g de polvo de frijol libre de lípidos en un matraz erlenmeyer de 50 ml y se agregan 30 ml del medio de extracción que contiene NaCl 0.5M, NaN<sub>3</sub> 0.02% y PMSF 0.1 mM.
- 2.- En otro matraz erlenmeyer de 50 ml, se pesan 3.0 g de polvo de frijol libre de lípidos y se agregan 30 ml de solución de NaCl 0.5M y NaN<sub>3</sub> 0.02%.
- 3.- Estas mezclas se agitan durante 3 horas a 4°C.
- 4.- Posteriormente se centrifugan en una Centrífuga Sor--

vall RC-58, rotor SS34 a 10,000 x G (9,000 rpm) durante 30 minutos y a 4°C.

5.- A ambos sobrenadantes se les determina su contenido de proteínas y se les hace su análisis electroforético. - El sedimento se descarta.

#### 4.3.3 Extracción de Proteínas.

1.- En un matraz erlenmeyer de 50 ml se pesan 3 g de polvo libre de lípidos y se agregan 30 ml de solución de NaCl 0.5M conteniendo  $\text{NaN}_3$  0.02%.

2.- La extracción se realiza poniendo la anterior mezcla en agitación constante con ayuda de una barra magnética durante 3 horas a 4°C.

3.- La mezcla se centrifuga en una Centrífuga Sorvall RC-58, rotor SS34 a 10,000 X G (9,000 rpm), durante 30 minutos y a 4°C.

4.- El sobrenadante se retira y se guarda a -20°C en un congelador revco hasta su utilización y se le llama Extracto Salino Total (EST).

5.- El sedimento se somete a otro proceso de extracción como en el paso 1.

#### 4.3.4 Extracción de la Globulina 1 (G1)

1.- En un matraz erlenmeyer de 50 ml poner 3 g de polvo libre de lípidos, adicionarle 30 ml de solución de NaCl 0.5M conteniendo ácido ascórbico 0.25M y  $\text{NaN}_3$  0.02%; la proteína se extrae agitando constantemente la mezcla durante 3 horas y a 4°C.

2.- Centrifugar a 10,000 x G durante 30 minutos y a 4°C.

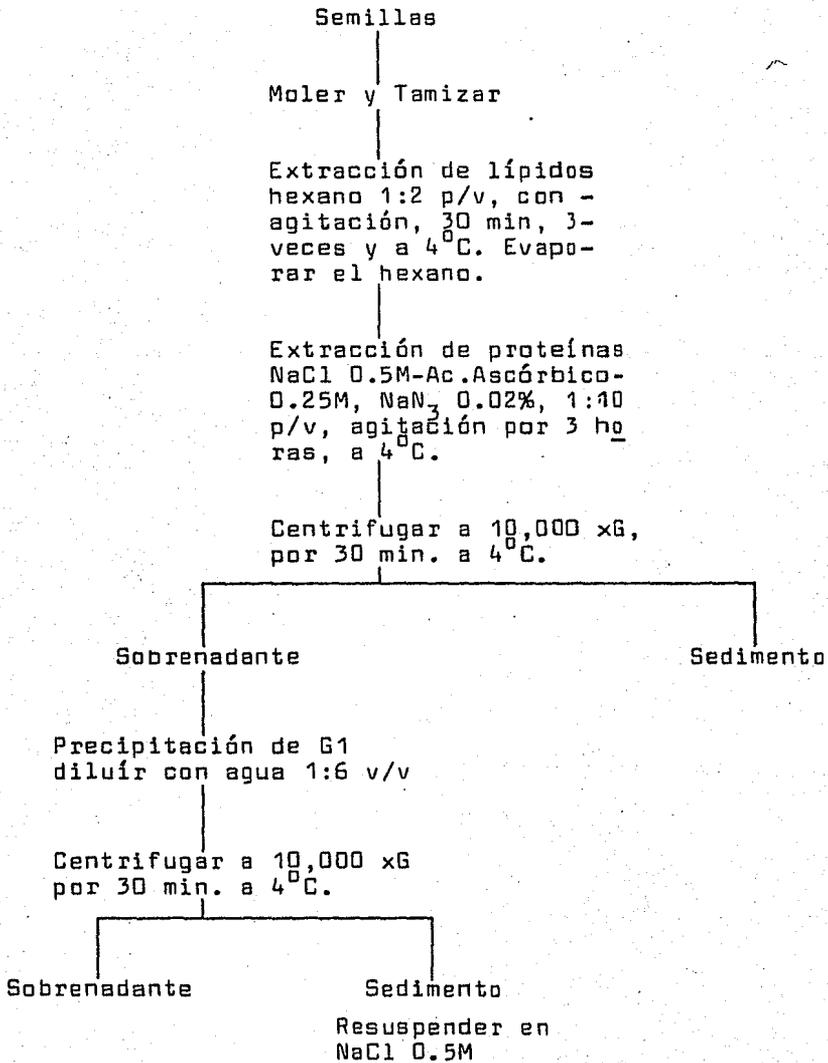


Fig. 7. Purificación de Globulina 1 (G1).

3.- El sobrenadante se retira y se le agregan cinco volúmenes de agua desmineralizada, la cual se agrega poco a poco y con agitación. El sedimento se descarta.

4.- El sobrenadante diluido se centrifuga a 10,000 x G durante 30 minutos y a 4°C.

5.- El sobrenadante se retira, y el precipitado se resuspende en el volumen deseado de solución de NaCl 0.5M con  $\text{NaN}_3$  0.02% (sin ácido ascórbico). El precipitado contiene la proteína G1. Esta fracción se somete a concentración en una Cámara Amicon con una membrana PM-30, se le determina su contenido de proteínas, se le hace su análisis -- electroforético, se puede aún purificar más pasándola en una columna empacada con Ultrogel AcA-34, la globulina G1 se almacena a -20°C.

El esquema de la purificación se ilustra en la figura No. 7.

#### 4.3.5. Extracción de la Globulina 2 (G2).

1.- En un matraz erlenmeyer de 50 ml pesar 3 g de polvo libre de lípidos, agregar 30 ml de solución de NaCl 0.06M con ácido ascórbico 0.25M y  $\text{NaN}_3$  0.02%; la mezcla se agita constantemente durante 3 horas a 4°C.

2.- Centrifugar a 10,000 x G (9,000 rpm) durante 30 minutos y a 4°C.

3.- El sobrenadante se retira y se diluye agregándole cinco volúmenes de agua desmineralizada, adicionándole poco a poco y con agitación. El sedimento se descarta.

4.- El sobrenadante diluido se centrifuga a 10,000 x G -- (9,000 rpm) durante 30 minutos y a 4°C.

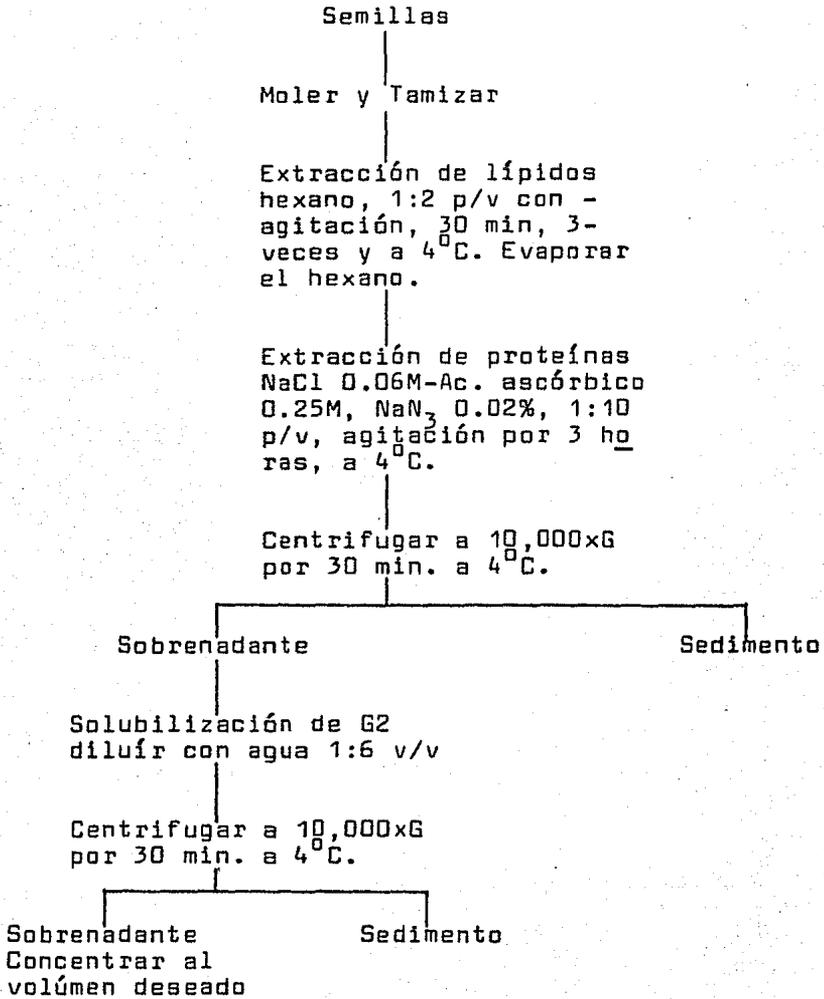


Fig. 8. Purificación de Globulina 2 (G2).

5.- El sobrenadante se retira. Esta fracción contiene la proteína G2. La cual se concentra en una cámara Amicon -- con una membrana PM-30, se le determina su concentración de proteínas, se le hace su análisis electroforético y si se quiere una purificación mayor se puede pasar por una columna empacada con Ultrogel AcA-34, se almacena la globulina a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

6.- El sedimento que contiene la poca G1 que se haya solubilizado, se descarta.

En la Fig. No. 8 se muestra en forma esquemática la anterior purificación.

#### 4.4. Determinación de Proteínas.

##### Soluciones:

- 1.- Solución "A".- Se disuelven 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 4 g de -- NaOH y 0.2 g de tartrato de sodio y potasio en agua desmineralizada y se lleva a 1000 ml. (El agua que se utiliza debe estar recientemente hervida por 30 min.)
- 2.- Solución "B".- Se pesa 1 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , se disuelve y se lleva a 200 ml con agua desmineralizada.
- 3.- Solución "C".- Esta solución se prepara inmediatamente antes de usarse y se hace agregando 1 ml de la solución "B" a 50 ml de la solución "A".
- 4.- Dilución del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu. -- Se hace una dilución 1:2 (v/v) del reactivo concentrado de Folin-Ciocalteu con agua desmineralizada; se prepara antes de usarse.
- 5.- Solución salina al 0.85% (p/v).- Se pesan 8.5 g de --

NaCl y se llevan a 100 ml con agua desmineralizada.

- 6.- Solución concentrada de albúmina sérica de bovino (BSA) (400 ug/ml).- Se pesan 10 mg de albúmina, se disuelven y se llevan a 25 ml con solución salina 0.85%. Esta solución se fracciona poniendo en tubos alicuotas de 1.25 ml. Se guardan en el congelador.
- 7.- Solución tipo de albúmina (50 ug/ml).- Se ponen 1.25-ml de la solución concentrada de albúmina en un matraz volumétrico de 10 ml y se completa su volumen con solución salina 0.85%.
- 8.- Se realizan las diluciones convenientes para cada una de las muestras problema de manera que estas tengan una concentración que caiga en el rango de la curva estandar.

#### Técnica.

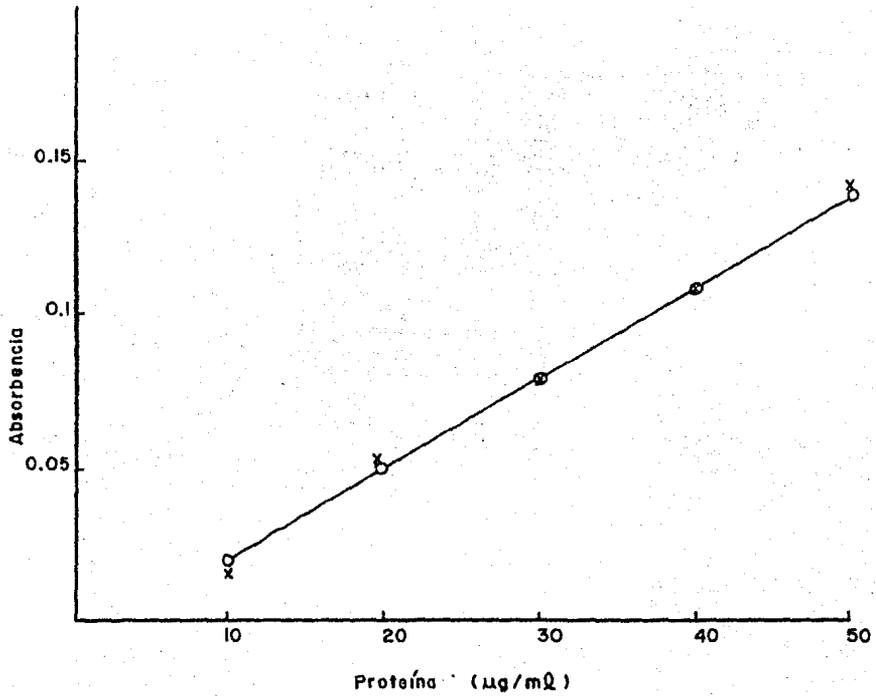
En tubos de vidrio de 15x150 mm, se colocan de la solución tipo de albúmina, cantidades crecientes (0.0, -- 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 ml) y 0.1 ml de la muestra problema diluida adecuadamente, completándose el volumen a cada tubo a 1 ml con solución salina al 0.85%.

Se agregan 5 ml de la solución "C" recién preparada, se agita y se deja reaccionar durante 10 minutos. Al cabo de este tiempo se agregan rápidamente 0.5 ml de la dilución del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu; el tubo se tapa con papel parafilm y se agita vigorosamente en un vortex.

Se leen a los 45 minutos de haberse agregado el re-

activo "C", en el espectrofotómetro ZEIZZ PMQ III a 660 nm contra agua.

Los resultados obtenidos con la curva estandar fueron tratados con el programa de mínimos cuadrados en una calculadora Texas TI-59, para obtener la recta de regresión. La concentración de cada una de las muestras problema, se calculó aprovechando la curva de regresión y multiplicándola por el factor de dilución. Con dicho programa se obtuvo el coeficiente de correlación y siempre fue cercano a la unidad. Los resultados de una determinación se ilustran en la gráfica No. 9.



Gráfica 1. Curva estándar de una determinación de proteínas por el método de Oyama y Eagle; x valores experimentales y o valores corregidos.

#### 4.5. Electroforesis Analítica.

La electroforesis analítica en rebanadas o slabs - de poliacrilamida se hace de acuerdo a Laemmli (16), con ligeras modificaciones. El gel separador a una concentración del 10.8% de acrilamida (11.08% T y 2.5% C) y el gel concentrador al 5% (5.0% T y 2.5 C), fueron preparados a partir de la solución concentrada de acrilamida al 30% -- bis-acrilamida al 0.8%. Normalmente, todas las separaciones se realizaran con este sistema a menos que se indique otra cosa.

Los geles fueron polimerizados químicamente por la adición de persulfato de amonio al 0.5% y temed al 0.5%.

#### Soluciones:

1.- Solución concentrada de acrilamida al 30% (p/v)-bis--acrilamida al 0.8% (P/v).- Pesar 30 g de acrilamida, - disolverlos en aproximadamente 20 ml de agua desmineralizada.

Pesar 0.8 g de bis-acrilamida, disolverlos en aproximadamente 50 ml de agua desmineralizada y mezclarla - con la solución de acrilamida. Aforar a 100 ml. Fil--trar. Esta solución se guarda en el refrigerador.

2.- Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% -- (p/v).- Pesar 10 g de SDS y disolverlos en agua des--mineralizada. Aforar a 100 ml.

3.- Solución de Tris-HCl 2.0M pH 8.8 (p/v).- Se pesan -- 121.1 g de trizma-base, disolverlos en agua desmine--ralizada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl y llevar a 500-ml con agua desmineralizada. Guardar en el refrigera--dor.

- 4.- Solución de Tris-HCl 1.0M pH6.8 (p/v).- Se pesan --  
60.55 g de trizma-base, disolverlos en agua desmine--  
ralizada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl y llevar a 500-  
ml con agua desmineralizada. Guardar en el refrigera-  
dor.
- 5.- Solución de persulfato de amonio al 0.5% (p/v).- Pe--  
sar 0.05 g de persulfato de amonio, disolverlos en --  
agua desmineralizada y aforar a 10 ml. Se prepara an-  
tes de usarse.
- 6.- Solución de temed al 0.5% (v/v).- Tomar 0.1 ml de --  
temed y llevarlos a 20 ml con agua desmineralizada.--  
Se prepara antes de usarse.
- 7.- Solución de azul de bromofenol 0.5% (p/v).- Pesar 0.5  
g de azul de bromofenol, disolverlos en agua desmine-  
ralizada y se afora a 100 ml.
- 8.- Solución digestora. Se prepara antes de usarse.
- |                       |                 |
|-----------------------|-----------------|
| Tris-HCl 1.0 M pH 6.8 | 2.50 ml         |
| SDS 10%               | 4.00 ml         |
| Glicerol              | 2.00 ml         |
| 2-mercaptoetanol      | 1.00 ml         |
| Azul de bromofenol    | 0.10 ml         |
| Agua desmineralizada  | <u>10.40 ml</u> |
|                       | 20.00 ml        |
- 9.- Solución "concentrada" tris 74 mM O glicina 767 mM.-  
Pesar 57.6 g de glicina y 9.0 g de trizma-base, se -  
disuelven en agua desmineralizada y se afora a 1000-  
ml.
- 10.- Amortiguador de "corrimiento" tris 18.5 mM - glicina

191 mM - SDS al 0.1%, pH 8.3.- A 500 ml de la solución concentrada de tris-glicina, se agregan 20 ml de SDS al 10%, se le ajusta el pH a 8.3. Aforar a 2000 ml con agua desmineralizada. Se prepara antes de usarse.

- 11.- Acido tricloroacético al 50% (p/v).- Pesar 250 g de ácido tricloroacético y disolverlos en agua desmineralizada, llevar a un volumen final de 50 ml.
- 12.- Colorante azul brillante de Coomassie R-250 al 0.1% en ácido tricloroacético al 50%.- Pesar 0.5 g de colorante y disolverlos en 500 ml de ácido tricloroacético al 50%. Filtrar.
- 13.- Acido acético al 7% (v/v).- Se toman 70 ml de ácido acético glacial y se llevan a 1000 ml con agua destilada.
- 14.- Acido tricloroacético al 12.5% (p/v).- Se pesan 62.5 g de ácido tricloroacético, se disuelven en agua desmineralizada y se llevan a 500 ml.
- 15.- Acido acético al 3% (v/v).- Se toman 30 ml de ácido acético glacial y se llevan a 1000 ml con agua destilada.
- 16.- Solución de ácido peryódico, al 1% (p/v) en ácido acético al 3%.- Se pesan 5 g de ácido peryódico, se disuelven en ácido acético al 3% y se llevan a 500 ml.
- 17.- Solución de metabisulfito de potasio al 0.5% (p/v).-- Se pesan 2.5 g de metabisulfito de potasio, se disuelven en agua desmineralizada y se llevan a 500 ml.
- 18.- Colorante azul Alciano al 0.5% (p/v) en ácido acético al 3%.- Se pesan 2.5 g de azul alciano, se disuelven-

en ácido acético al 3% y se llevan a 500ml. Filtrar.

- 19.- Solución Tris-HCl 0.1M pH 8.8 (p/v).- Se pesan 6.55-g de trizma-base, se disuelven en 450 ml de agua des-mineralizada. Se ajusta a pH 8.8 con HCl y se afora-a 500 ml con agua desmineralizada.
- 20.- Solución Tris-HCl 0.1 M pH 6.8 (p/v).- Se pesan 6.55 g de trizma-base, se disuelven en 450 ml de agua des-mineralizada. Se ajusta a pH 6.8 con HCl y se afora-a 500 ml con agua desmineralizada.
- 21.- Mezcla metanol-ácido acético 7% (5:7).- Se mezclan - 400 ml de m etanol y 560 ml de ácido acético al 7%.
- 22.- Mezcla metanol-agua, (5:7).- Se mezclan 200 ml de me-tanol y 280 ml de agua desmineralizada.
- 23.- Mezcla metanol-tris-HCl 0.1 M pH 8.8-dimetil sulfóxi-do, (5:5.8:1.2).- Se mezclan 200 ml de metanol, 232-ml de tris-HCl 0.1 M pH 8.8 y 48 ml de dimetil sul-fóxido.
- 24.- Mezcla de metanol-tris-HCl 0.1 M pH 8.8-dimetil sul-fóxido, (5:0.8:1.2)-DDD al 0.02%.- Se toman 100 ml.- de metanol y 24 ml de dimetil sulfóxido y se mezclan en esta se disuelven 0.48 g de DDD. Cuando se ha di-suelto totalmente el DDD, se agregan 116 ml de tris-HCl 0.1 M pH 8.8.
- 25.- Mezcla metanol-agua-dimetil sulfóxido, (5:5,8:1,2).- Se mezclan 200 ml de metanol con 232 ml de agua des-mineralizada y 48 ml de dimetil sulfóxido.
- 26.- Mezcla metanol-agua pH 4.0, (3:7).- Se mezclan 150 -

ml de metanol y 350 ml de agua desmineralizada, se -  
ajusta a pH 4.0 con una solución de HCl 0.1 N.

27.- Mezcla metanol-tris-HCl 0.1 M pH 7.0-dimetil sulfóxido, (2:17:1).- Se mezclan 40 ml de metanol con 340 ml de tris-HCl pH 7.0 y 20 ml de dimetil sulfóxido.

28.- Mezcla metanol-tris-HCl 0.1 M pH 8.0-dimetil sulfóxido, (2:17:1)-fast black K al 0.1%.- Se mezclan 40 ml de metanol con 340 ml de tris-HCl 0.1 M pH 7.0 y 20 ml de dimetil sulfóxido. Se agregan 0.4 g de fast -- black K con agitación constante. Filtrar.

### Técnica.

1.- El ensamble de la cámara se lleva a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.- Se coloca la unidad sobre la mesa de nivelación y con el nivel de burbuja se nivela la unidad.

3.- Preparación de Geles.

a) Gel separador al 10.8% (para 2 slabs).

Agua desmineralizada	14.55 ml
Tris-HCl 2.0 M pH 8.8	11.25 ml
SDS 10%	0.60 ml
Solución concentrada de acrilamida bis	21.60 ml
Vacío por 5 minutos	
Persulfato de amonio 0.5%	6.00 ml
Temed 0.5%	6.00 ml.
	<hr/>
	60.00 ml

b) Gel concentrador al 5% (para 2 slabs)

ml de metanol y 350 ml de agua desmineralizada, se ajusta a pH 4.0 con una solución de HCl 0.1 N.

27.- Mezcla metanol-tris-HCl 0.1 M pH 7.0-dimetil sulfóxido, (2:17:1).- Se mezclan 40 ml de metanol con 340 ml de tris-HCl pH 7.0 y 20 ml de dimetil sulfóxido.

28.- Mezcla metanol-tris-HCl 0.1 M pH 8.0-dimetil sulfóxido, (2:17:1)-fast black K al 0.1%.- Se mezclan 40 ml de metanol con 340 ml de tris-HCl 0.1 M pH 7.0 y 20 ml de dimetil sulfóxido. Se agregan 0.4 g de fast black K con agitación constante. Filtrar.

### Técnica.

1.- El ensamble de la cámara se lleva a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.- Se coloca la unidad sobre la mesa de nivelación y con el nivel de burbuja se nivela la unidad.

3.- Preparación de Geles.

a) Gel separador al 10.8% (para 2 slabs).

Agua desmineralizada	14.55 ml
Tris-HCl 2.0 M pH 8.8	11.25 ml
SDS 10%	0.60 ml
Solución concentrada de acrilamida bis	21.60 ml
Vacío por 5 minutos	
Persulfato de amonio 0.5%	6.00 ml
Temed 0.5%	6.00 ml.
	<hr/>
	60.00 ml

b) Gel concentrador al 5% (para 2 slabs)

Solución concentrada de acrilamida-bis	3.30 ml
Tris-HCl 1.0 M pH 6.8	2.50 ml
SDS 10%	0.20 ml
Agua desmineralizada	10.00 ml
Vacío por 3 minutos	
Persulfato de amonio 0.5%	2.00 ml
Temed 0.5%	<u>2.00 ml</u>
	20.00 ml

4.- La solución del gel separador es agregada lentamente en la placa formadora de gel cuidando de excluir las burbujas de aire. Se agrega tal cantidad (aproximadamente 17 ml) que esta llegue a una distancia de 3 cm del borde superior de las placas de vidrio.

5.- La superficie del gel separador puede ser formado ya sea por los peines formadores o estratificando cuidadosamente agua desmineralizada, antes de la polimerización -- del gel.

6.- Se deja polimerizar por lo menos durante 2 horas el gel separador, se quita el peine formador o el agua invirtiendo la unidad. Se enjuaga dos veces la superficie del gel con agua desmineralizada y se seca con papel filtro para quitar el sobrante de gel que no haya polimerizado.

7.- Se insertan entre las placas de vidrio los peines formadores de pozos y se coloca la unidad en la mesa de nivelación. Se añade lentamente el gel concentrador por uno de los extremos del peine, si hay formación de burbujas se sacan los peines y se vuelven a insertar.

8.- Se dejan polimerizar, por lo menos durante 2 horas, se añade agua destilada alrededor del peine, se flexiona-

levemente y se extrae el peine.

9.- Los pozos se enjuagan dos veces con agua desmineralizada y una tercera con amortiguador de corrimiento, dejándose llenos con este amortiguador hasta que se aplique la muestra.

10.- Las muestras antes de ser aplicadas son previamente digeridas diluyéndolas volúmen a volúmen con solución digestora y posteriormente son sometidas a ebullición durante 2 minutos en un baño maría. Las muestras se diluyen -- previamente en base a su concentración de proteínas, de -- tal manera que se pone en cada pozo una cantidad conocida que varía entre 60 y 80 Mg de proteína.

11.- Cada muestra es aplicada con una microjeringa en su respectivo pozo. Enseguida con mucho cuidado se llenan -- los pozos con el amortiguador de corrimiento.

12.- Se coloca la unidad dentro de la cámara inferior, se agrega amortiguador de corrimiento (aproximadamente 1.5 l) hasta cubrir aproximadamente la mitad de la unidad. Se -- eliminan las burbujas de la superficie inferior de los -- geles.

13.- La parte superior de la unidad se llena con amortiguador de corrimiento. Se tapa la cámara. Los electrodos se conectan a una fuente de poder regulada, teniendo cuidado que coincidan los colores de los electrodos.

14.- El corrimiento se realiza con corriente constante a 20 mAmp, o sea 10 mAmp/gel.

15.- El corrimiento se suspende cuando el colorante de -- frente (azul de bromofenol) alcanza una distancia de 1 cm

del borde inferior del gel. La fuente se apaga, se desconecta la cámara, se desarma la unidad, los geles se pasan a un recipiente con agua. Enseguida los geles son teñidos con cualquiera de las siguientes técnicas:

4.5.1. Tinción de Proteínas con azul brillante de Coomassie. De acuerdo a Laemmli (16).

- 1.- Fijar los geles en ácido tricloroacético al 50%, durante 60 minutos.
- 2.- Teñir los geles con el colorante azul brillante de Coomassie R-250, durante 60 minutos.
- 3.- Los geles se destiñen con cambios continuos de ácido acético al 7% y se conservan en el refrigerador.

4.5.2. Tinción de Glucoproteínas con Azul Alciano. Se realiza de acuerdo al método descrito por Wardi, A. y Michos, G. (17).

- 1.- Los geles se fijan en ácido tricloroacético al 12.5% durante 30 min.
- 2.- Se lavan con agua destilada varias veces, y se colocan durante 50 minutos en la solución de ácido peryódico-ácido acético.
- 3.- Se remueve el exceso de peryodato, colocando los geles en la solución de metabisulfito de potasio.
- 4.- Los geles se lavan varias veces con agua destilada y se tiñen con el colorante azul Alciano disuelto en ácido acético, durante 4 horas.
- 5.- Los geles se destiñen con ácido acético al 3%.

4.5.3. Tinción de proteínas con grupos sulfhidrilos. Se realiza de acuerdo al método descrito por Telser, A. y Rovin, B. (18)

- 1.- Los geles se fijan durante la noche en la mezcla metanol-ácido acético.
- 2.- Por la mañana, se les cambia la mezcla metanol-ácido-acético, se les deja en ésta durante 20 minutos.
- 3.- Se tratan los geles, con la mezcla metanol-agua (5:7) durante 20 minutos, transcurrido este lapso se les -- pone nueva mezcla y se dejan otros 20 minutos.
- 4.- Los geles se pasan a la mezcla metanol-tris-HCl-dimetil sulfóxido y se dejan durante 20 minutos. Se repite una vez más éste paso, cambiándose la mezcla.
- 5.- Se incuban con la mezcla metanol-tris-HCl dimetil sulfóxido-DDD, durante 15 minutos a 50-55°C, en una estufa eléctrica.
- 6.- Se cambia la mezcla anterior por mezcla metanol-agua-dimetil sulfóxido y se deja actuar durante 20 minutos. Se repite una vez más este lavado, renovando la mezcla.
- 7.- Los geles se tratan con la mezcla metanol-agua (3:7), durante 20 minutos. Se repite una vez más este paso, cambiándose la mezcla.
- 8.- Se cambia la mezcla anterior y se dejan durante 20 minutos en la mezcla metanol-tris-HCl-dimetil sulfóxido. Se repite este paso, cambiando la mezcla.
- 9.- Enseguida, los geles se colocan en la mezcla metanol-

tris-HCl-dimetil sulfóxido-fast black K, durante 10 minutos.

10.- Los geles se lavan con agua desmineralizada.

#### 4.6. Análisis Densitométrico.

##### 4.6.1. Deshidratación de geles.

- 1.- El gel desteñido se coloca en la mezcla glicerol-ácido acético durante 45 min.
- 2.- Se pone en una charola la pantalla de acero, se le colocan encima dos hojas de papel filtro grueso y se agrega agua destilada a que cubra el papel filtro.
- 3.- Tratar dos hojas de cellophan con la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + EDTA en ebullición durante 5 min. Enjuagar con agua destilada.
- 4.- Transferir una de las hojas de cellophan a la charola, poniéndola sobre las hojas de papel filtro, evitando la formación de burbujas y sobre ésta colocar cuidadosamente el gel cubriéndolo con la otra hoja de cellophan.
- 5.- Pasar la pantalla, papel filtro, cellophan, gel, cellophan al secador, poner una hoja de parafilm sobre la hoja superior de cellophan y quitar las arrugas o burbujas.
- 6.- Poner la hoja de Myler (plástico grueso) con el lado más liso sobre el gel.
- 7.- Alinear el papel filtro y la hoja de Myler de tal manera que los bordes estén parejos con la pared interna --

del bloque de secado.

8.- Se cubre el bloque con la hoja de silicón rojo y se conecta al vacío.

9.- Después de la formación del vacío, se enciende el elemento calefactor, se deja de 5-10 min para que alcance su temperatura de operación.

10.- Se ajusta el tiempo de secado a 2 horas.

#### 4.6.2. Densitometría.

La Densitometría se realizó en un densitómetro Automático computarizado Gelman ACD-18, siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.- De un gel previamente deshidratado, se escoge la muestra que se desea analizar y se recorta. Se limpia perfectamente con una gasa humedecida con agua desmineralizada.

2.- Se calibra el densitómetro de acuerdo a las instrucciones del fabricante, buscando las condiciones óptimas de:

- a) Longitud de onda.
- b) Amplitud de barrido
- c) Rango de densidad óptica
- d) Autogranancia.

#### 4.7. Estimación de Pesos Moleculares.

La estimación de pesos moleculares se realiza electroforéticamente de acuerdo a Weber y Osborne. (19) con ligeras modificaciones. Se comparan los problemas con pro--

teínas de peso molecular conocido como la mioglobina, inhibidor de tripsina, DNAasa I y albúmina de huevo.

Los geles se preparan, corren y tiñen como se señalan en el inciso 4.5 y 4.5.1.

La gráfica logaritmo peso molecular versus movilidad relativa de las proteínas de peso molecular conocido y se intercala la movilidad de las proteínas problema para conocer su peso molecular.

#### 4.8. Hidrólisis de las Proteínas.

##### Soluciones.

- 1.- NaCl 0.5 M con  $\text{NaN}_3$  0.02%.- Se disuelven 14.625 g de NaCl y 0.1 g de  $\text{NaN}_3$  en agua desmineralizada y se añora a 500 ml.
- 2.- Dodecil sulfato de sodio 10% (p/v).- Se disuelven 10-g de SDS en agua desmineralizada y se llevan a 100 ml.
- 3.- HCl 1.0 N (v/v).- Se toman 4.2 ml de HCl concentrado y se llevan a 50 ml con agua desmineralizada.
- 4.- HCl 0.05 N (v/v).- Se toman 0.21 ml de HCl concentrado y se llevan a 50 ml con agua desmineralizada.
- 5.- HCl 0.01 N (v/v).- Se toman 0.042 ml de HCl concentrado y se llevan a 50 ml con agua desmineralizada.
- 6.- HCl 0.001 N (v/v).- Se toman 5.0 ml de HCl 0.01 N y se llevan a 50 ml con agua desmineralizada.
- 7.- Acido perclórico al 5% (v/v).- Se toman 5.0 ml de ácido perclórico y se llevan a 100 ml con agua desminera-

lizada.

- 8.- Solución de hemoglobina 1.67% (p/v).- Se disuelven -- 0.167 g de hemoglobina en 10 ml de HCl 0.05 N.
- 9.- Solución de pepsina 0.2% (p/v).- Se disuelven 0.02 g de pepsina en 10 ml de HCl 0.01 N.
- 10.- Fenil metil sulfonil fluoruro 50 mM.- Se disuelven - 0.0174 g de PMSF en 2.0 ml de dimetil sulfóxido.
- 11.- Acido bórico 1.0 M y NaCl 0.292%.- Se disuelven 6.184 g de ácido bórico y 0.292 g de NaCl en agua desmine-- realizada y aforar a 100 ml.
- 12.- NaOH 1.0 N (p/v).- Se disuelven 4.0 g en agua desmi-- neralizada y se afora a 100 ml.
- 13.- NaOH 0.5 N (p/v).- Se disuelven 2.0 g en agua desmi-- neralizada y se afora a 100 ml.
- 14.-  $\text{CaCl}_2$  5% (p/v).- Se disuelven 2.5 g  $\text{CaCl}_2$  en agua des-- mineralizada y se llevan a 50 ml.
- 15.- Solución de tripsina 0.2% (p/v).- Se disuelven 0.020- g de tripsina en 10.0 ml de HCl 0.001 N.
- 16.- Reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu diluido 1:3 (v/v).- Se toma un volumen de reactivo fenólico se le añaden - dos volúmenes de agua desmineralizada, para ajustar su concentración a 1.0 N.
- 17.- Tris-HCl 1.0 M pH 6.8.- Se disuelven 12.11 g de triz- ma base en agua desmineralizada. Se ajusta el pH a -- 6.8 con HCl y se lleva a 100 ml con agua desminerali- zada. Guardar en el refrigerador.

18.- Azul de bromofenol 0.5% (p/v).- Se disuelven 0.125 g de azul de bromofenol en agua desmineralizada, aforar a 25 ml.

19.- Solución digestora.- Se prepara mezclando las siguientes soluciones:

Tris-HCl 1.0 M pH 6.8	2.50 ml
SDS 10%	4.00 ml
Glicerol concentrado	2.00 ml
2-mercaptoetanol	1.00 ml
Azul de bromofenol 0.5%	0.10 ml
Agua desmineralizada	<u>10.40 ml</u>
	20.00 ml

#### 4.8.1. Medición de la actividad de las enzimas Pepsina y Tripsina.

Previamente a la digestión de las proteínas de frijol se probó la actividad de las enzimas pepsina y tripsina - utilizando como substrato hemoglobina bovina.

a) Hidrólisis de hemoglobina con Pepsina. Se realizó de acuerdo al método descrito por Rick y Fritsch (20).

- 1.- En un tubo de ensaye se ponen 10 ml de la solución de hemoglobina, se ajusta el pH a 1.0 con HCl 1.0 N.
- 2.- El Tubo se preincuba en un baño maría a 35.5°C durante 5 min. La solución de pepsina también se somete a este tratamiento.
- 3.- Al tubo que contiene la solución de hemoglobina se le adiciona a 0.025 ml de solución de pepsina 0.2% se -- mezcla suavemente e inmediatamente se toma 0.5 ml y -- se depositan en un tubo que contiene 2 ml de ácido --

perclórico al 5%, frío, se agita vigorosamente y se marca como tiempo cero.

- 4.- El tubo que contiene la mezcla hemoglobina-pepsina se coloca de nuevo en el baño maría y a los 10, 20, 30, 40, 50, y 60 min. respectivamente se vuelven a tomar otros 0.5 ml y se inactivan en ácido perclórico al 0.5%, frío.
- 5.- Los tubos se centrifugan a 3000 rpm durante 15 min y se transfiere el sobrenadante a tubos limpios.
- 6.- Leer a 280 nm, en un espectrofotómetro PMQ III Zeiss-ajustándolo con agua.
- 7.- Graficar absorbencia versus tiempo de reacción.

b) Hidrólisis de hemoglobina con tripsina.- Se realizó de acuerdo al método descrito por Rick, W. (21)

Previamente a la hidrólisis, la hemoglobina se sometió al siguiente tratamiento: se resuspenden 0.5 g de hemoglobina en 5.0 ml de agua desmineralizada y se agregan 9.0 g de urea, 2.0 ml de NaOH 1.0 N; se deja en reposo durante 60 min. a temperatura ambiente para la desnaturalización de la hemoglobina. Añadir 2.5 ml de la solución -- ácido bórico-NaCl, 1.1 ml de CaCl<sub>2</sub> al 5%, ajustar el pH a 7.5 con HCl 1.0 N y finalmente diluir a 25 ml en un matraz aforado.

- 1.- En un tubo de ensaye se colocan 10 ml de hemoglobina-desnaturalizada, se preincuba en un baño maría a 35.5 °C durante 5 min. La solución de tripsina también se somete a este tratamiento.

- 2.- Al tubo que contiene la hemoglobina se le adiciona -- 0.025 ml de la solución de tripsina al 0.2%, mezclar suavemente e inmediatamente se toma una alícuota de - 0.5 ml la cual se deposita en un tubo que contiene 2- ml de ácido perclórico al 5% frío, agitar vigorosamente y conservar en hielo.
- 3.- El tubo que contiene la mezcla hemoglobina-tripsina - se coloca de nuevo en el baño maría y a los 10, 20, - 30, 40, 50 y 60 min. de reacción, se toman 0.5 ml y - se inactivan en ácido perclórico al 5% frío como se - señala anteriormente.
- 4.- Los tubos se centrifugan a 3000 rpm durante 15 min y - el sobrenadante libre de proteínas se transfiere a tu- bos limpios.
- 5.- A 1.0 ml de extracto libre de proteínas de cada uno - de los tiempos de reacción se les agrega 2 ml de NaOH 0.5 N y 0.6 ml de reactivo fenólico diluido y se leen a los 10 min a 578, 691 y 750 nm.
- 6.- Graficar absorbencia versus tiempo de reacción.

#### 4.8.2. Análisis electroforético de las pro- teínas de frijol desnaturalizadas.

El tratamiento a las proteínas de frijol se efectuó - como sigue:

##### a) Desnaturalización por calentamiento. (control)

- 1.- En un tubo de ensaye se coloca 1.0 ml de extracto sa- lino total y 4.0 ml de NaCl 0.5 M con  $\text{NaN}_3$  0.02%.
- 2.- Se coloca en un baño maría en ebullición, a los 30 min se toman 0.5 ml se pasan a un tubo que contiene 0.5 ml

de solución digestora, se tapa y agita vigorosamente. Se pone en ebullición durante 2 min en un baño maría.

- 3.- El tubo que contiene el extracto salino total se re-- gresa inmediatamente al baño maría en ebullición. Re-- pitiendo el paso anterior a los 60, 90 y 120 min. -- respectivamente.
- 4.- Se guarda el extracto desnaturalizado para utilizarlo posteriormente en su prueba de digestibilidad.
- 5.- Las muestras digeridas se analizan electroforéticamen-- te, como se indica en la técnica de electroforesis.

b) Desnaturalización por calentamiento en presencia - de un inhibidor de Proteasas.

- 1.- En un tubo de ensaye se coloca 1.0 ml de extracto sa-- lino total, 4.0 ml de NaCl 0.5 M con  $\text{NaN}_3$  0.02% y -- 0.010 ml de solución de PMSF 50 mM.
- 2.- Se coloca en un baño maría en ebullición, a los 30 -- min se toman 0.5 ml y se pasan a un tubo que contenga 0.5 ml de solución digestora, se tapa y agita vigoroso-- samente. Se coloca en un baño maría en ebullición y - se deja durante 2 min.
- 3.- El resto de la mezcla extracto salino total-PMSF se - mantiene en un baño maría en ebullición, repitiendo -- el paso anterior a los 60, 90 y 120 min. respectiva-- mente.
- 4.- Con las muestras digeridas se realiza el análisis --- electroforético, como se indica en la técnica de elec-- troforesis.

c) Desnaturalización por calentamiento en presencia -  
de un detergente.

- 1.- En un tubo de ensaye se coloca 1.0 ml de extracto salino total, 3.5 ml de NaCl 0.5 M con  $\text{NaN}_3$  0.02% y 0.5 ml de SDS 10%.
- 2.- Se coloca en un baño maría en ebullición, a los 30 -- min se toman 0.5 ml y se pasan a un tubo que contiene 0.5 ml de solución digestora, se tapa y agita vigorosamente. Se pasa a un baño maría en ebullición y se deja durante 2 min.
- 3.- El resto de la mezcla extracto salino total-SDS se -- mantiene en el baño maría en ebullición repitiendo el paso anterior a los 60, 90 y 120 min respectivamente.
- 4.- Se guarda el extracto desnaturalizado para utilizarlo posteriormente en su prueba de digestibilidad.
- 5.- Las muestras digeridas se analizan electroforéticamente, como se indica en la técnica de electroforesis.

d) Desnaturalización por calentamiento en presencia -  
de Dodecil sulfato de sodio (SDS) y del Inhibidor  
de Proteasas (PMSF).

- 1.- En un tubo de ensaye se coloca 1.0 ml de extracto salino total, 3.5 ml de NaCl 0.5 M con  $\text{NaN}_3$  0.02%, 0.5-ml de SDS al 10% y 0.010 ml de solución de PMSF 50 mM.
- 2.- Se coloca en un baño maría en ebullición, a los 30 -- min se toman 0.5 ml y se pasan a un tubo que contiene 0.5 ml de solución digestora, se tapa y agita vigorosamente. Se deja durante 2 min. en un baño maría en ebullición.

- 3.- La mezcla extracto salino total-SDS-PMSF se sigue calentando y a los 60, 90 y 120 min. respectivamente se repite el paso anterior.
- 4.- Las muestras digeridas se analizan electroforéticamente, como se indica en la técnica de electroforesis.

#### 4.8.3. Hidrólisis de las proteínas desnaturalizadas.

La digestibilidad de las proteínas de frijol se realizó de acuerdo al método descrito por Rick y Frisch (24).

Se utilizaron las muestras tratadas durante 120 min.- por los métodos señalados anteriormente, utilizando como referencia un extracto salino diluido en solución de NaCl-NaN<sub>3</sub> y sin ningún tratamiento.

##### a) Hidrólisis con pepsina.

- 1.- El extracto salino total nativo (control) se diluye - 1:5 poniendo en un tubo de ensaye 1.0 ml del extracto y 4.0 ml de NaCl 0.5 M con NaN<sub>3</sub> 0.02%.
- 2.- En diferentes tubos se ponen 1.5 ml de cada uno de -- los extractos desnaturalizados. En otro tubo se pone 1.5 ml de extracto salino nativo. A todos los tubos - se les ajusta el pH a 1.0 con HCl 1.0 N.
- 3.- Los tubos se preincuban a 35.5<sup>0</sup>C durante 5 min. La solución de pepsina al 0.2% también se somete a este -- tratamiento.
- 4.- A diferentes tiempos a cada uno de los tubos se les - adiciona 0.010 ml de la solución de pepsina al 0.2%, - se mezclan suavemente e inmediatamente se toman 0.1 -

ml que se pasan a un tubo que contiene 0.1 ml de la solución digestora, se tapa y agita vigorosamente y se coloca en un baño maría en ebullición durante 2 min. (tiempo cero).

5.- Los tubos que contienen la mezcla extracto salino total-pepsina se mantienen en el baño maría a 35.5°C y a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min respectivamente, se toma de cada uno otras alícuotas de 0.1 ml y se inactivan en la forma ya señalada.

6.- A las muestras digeridas se les hace su análisis electroforético como se indica en la técnica de electroforesis.

b) Hidrólisis con tripsina.

1.- En diferentes tubos se colocan 1.5 ml de extracto salino nativo diluido 1:5 con NaCl 0.5 M con  $\text{NaN}_3$  0.02% y 1.5 ml de cada uno de los extractos desnaturalizados durante 120 min. Se les ajusta el pH a 7.5 con NaOH 0.1 N.

2.- Los tubos se preincuban a 35.5°C durante 5 min. La solución de tripsina al 0.2%, también se somete a este tratamiento.

3.- A distintos intervalos de tiempo a cada uno de los tubos se les adiciona 0.010 ml de solución de tripsinal 0.2%, se mezclan suavemente e inmediatamente se toman 0.1 ml y se pasan a un tubo que contenga 0.1 ml. de solución digestora, se tapa y agita vigorosamente y se colocan en un baño maría en ebullición durante 2 min. (tiempo cero).

4.- Los tubos que contienen la mezcla extracto salino to-

tal-tripsina se colocan de nuevo en el baño maría a - 35.5°C y a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min respectivamente, se toman alicuotas de 0.1 ml y se inactivan en la forma señalada anteriormente.

- 5.- Las muestras digeridas se analizan electroforéticamente como se indica en la técnica para electroforesis.

#### 4.9. Cromatografía de exclusión molecular.

La Cromatografía de exclusión molecular se realiza en una columna de vidrio marca Pharmacia con un diámetro interno de 2.5 cm y 1.0 metro de altura. El empaque, equilibrio y elución se hace de acuerdo a las instrucciones del fabricante del gel. La velocidad de flujo se controla con presión hidrostática.

##### Soluciones.

- 1.- Amortiguador NaCl 0.5 M con  $\text{NaN}_3$  0.2% (p/v).- Se pesan 58.5 g de NaCl, 0.4 g de  $\text{NaN}_3$ , se disuelven en agua desmineralizada y se llevan a 2,000 ml.
- 2.- Dextrana azul al 0.3% (p/v).- Se pesan 0.03 g de dextrana azul, se disuelven en agua desmineralizada y se llevan a 10 ml.

##### 4.9.1. Preparación del Ultrogel.

El Ultrogel viene ya pre hidratado, y la cantidad requerida se calcula multiplicando el área seccional - - - ( $3.1416 \times r^2$ ) por la altura de la columna. Por el uso de émbolos, se utiliza unicamente el 90% del volúmen total de la columna.

- 1.- En una probeta de 1,000 ml se miden 450 ml de Ultrogel, se agregan 150 ml (40% del volúmen total) de amortiguador NaCl 0.5 M- $\text{NaN}_3$  0.02% y se mezclan con una varilla de vidrio hasta hacer una suspensión homogénea.
- 2.- Esta suspensión se pasa a un matraz quitazato y se desgasifica mediante una bomba de vacío para eliminar la formación de burbujas de aire en el lecho del gel.

#### 4.9.2. Preparación de la columna.

- 1.- Se introduce el émbolo inferior de la columna ajustándolo a las paredes mediante el tornillo exterior del émbolo.
- 2.- La columna se monta verticalmente, alineándola mediante una plomada.
- 3.- En la parte superior de la columna se coloca a manera de depósito un embudo.
- 4.- En la parte inferior de la columna se ponen 20 ml de amortiguador NaCl 0.5 M-Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub> 0.02%, el cual luego se deja salir hasta que alcance un nivel de aproximadamente 2 cm arriba del émbolo.

#### 4.9.3. Empaque de la columna.

- 1.- La suspensión de Ultrogel se vierte en la columna con ayuda de una varilla de vidrio, cuidando que no se formen burbujas de aire en el gel y que quede en el embudo un exceso de gel.
- 2.- El Ultrogel, se deja que se sedimente por 5 min. y se abre la salida para iniciar el empaque.
- 3.- La regulación del flujo de empaque es determinada por las propiedades del gel y las dimensiones de la columna. En este caso, se utiliza una presión de operación de 70 cm, distancia que debe de haber entre la entrada y salida del amortiguador (extremos expuestos a la presión atmosférica).
- 4.- El empaque termina cuando el nivel del gel permanece constante, por lo menos durante 15 min.

- 5.- Se retira el embudo y su contenido.
- 6.- Se coloca el émbolo superior de la columna ajustándolo a las paredes de la columna mediante su tornillo exterior. Este émbolo se conecta a un matraz de Mariotte, el cual contiene amortiguador desgasificado de NaCl -  $\text{NaN}_3$  0.02%.

#### 4.9.4. Equilibrio del Ultrogel.

El equilibrio de la columna se realiza haciéndole pasar por lo menos dos volúmenes (1000 ml) de la columna de amortiguador de elución, que en este caso es NaCl 0.5M- $\text{NaN}_3$  0.02%, con una presión de operación del 90% de la de empaque, (56 cm). Después de su equilibrio la columna queda lista para su uso.

Antes de ser usada la columna se revisa su empaque y equilibrio haciéndole pasar una muestra de 5.0 ml de azul dextrana al 0.3%, que se debe mover a través de la columna como una banda uniforme, y eluir en un volumen no mayor de 100 ml.

#### 4.9.5. Introducción de la muestra.

El volumen de la muestra puede ser del 0.5 al 4% del volumen total de la columna, con una concentración variable de proteínas.

Antes de aplicar la muestra hay que drenar el amortiguador hasta dejar una pequeña capa (2 a 3 mm) por encima del gel. La muestra se aplica sobre la superficie del gel con una bomba monostaltica Buchler, procurando no alterar la superficie del gel.

Cuando se ha terminado de aplicar la muestra se reanu-

da el flujo para que la muestra entre al gel. Con la misma bomba se aplica amortiguador a la superficie y se conecta nuevamente al matraz de Mariotte.

#### 4.9.6. Elución de la muestra.

- 1.- La elución se realiza con una presión de operación de 25 cm.
- 2.- La salida de la columna se conecta a un Colector de fracciones automático FRACTO METTE 400, Buchler.
- 3.- Se colectan fracciones de 5.0 ml con un flujo de 19 - ml/hora. Se leen en el espectrofotómetro ZEISS PMQ -- III a 260 nm y 280 nm contra NaCl 0.5 M-NaN<sub>3</sub> 0.02%.
- 4.- Se grafica absorbancia a las distintas longitudes contra número de tubo ó fracción.
- 5.- De acuerdo a la gráfica se seleccionan las fracciones con mayores absorbancias y se concentran a un volúmen aproximado de 2 ml en una cámara Amicon con una membrana PM-30. Se les determina su concentración de proteína por el método de Dyama y Eagle (15), se les hace su análisis electroforético. Las fracciones se almacenan a -20°C.

En todos los casos el amortiguador se utiliza desgasificado y a la temperatura que se realizará la elución.

## 5.0 RESULTADOS.

Para comprobar que durante el proceso de extracción, las proteínas no sufrían ningún cambio ocasionado por la acción de laguna enzima proteolítica, se efectuó en presencia y ausencia del inhibidor de proteasas fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), una extracción utilizando únicamente una variedad de cada una de las tres especies, que fueron: Bayo Baranda (P. vulgaris L.), # 209 (P. coccineus) y Tecuzi 1-74 (P. acutifolius). Los resultados se muestran en la fig. 9, donde se aprecia que no existe diferencia en la movilidad electroforética con y sin inhibidor de proteasas, por lo que se consideró innecesaria la adición del inhibidor en las siguientes extracciones.

Los extractos salinos totales de las 10 variedades de cada una de las tres especies, fueron analizadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida -SDS, los resultados se exhiben en la fig. 10, 11 y 12 respectivamente, donde se observa que en cada especie existe mucha semejanza en el número de bandas y su movilidad. Para contrastar las semejanzas o diferencias electroforéticas de las proteínas de los extractos salinos totales de las especies en estudio, se realizó un corrimiento electroforético alternando los extractos de las tres especies en un mismo gel y se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250. Los resultados se presentan en la fig. 13 a 16, apreciándose en los distintos extractos gran similitud en la movilidad de las proteínas de mayor peso molecular, mientras que en las de menor peso molecular presentan una banda en común y dos diferentes. En forma semejante se realizó un corrimiento electroforético pero sometiendo dichos geles a tinciones -

específicas para proteínas con grupos sulfhidrilos y para glucoproteínas. Parte de los resultados de la tinción para grupos sulfhidrilos se muestran en la fig. 17. Los geles teñidos para glucoproteínas no se muestran por su inestabilidad a la luz lo que imposibilitó su fotografía. En cada uno de los distintos extractos, las bandas que se tiñeron con azul brillante de Coomassie, también se tiñeron para proteínas con grupo sulfhidrilo y para glucoproteínas.

Los geles teñidos con azul brillante de Coomassie R-250, fueron deshidratados para realizar en los pozos o carriles de las siguientes variedades: Bayo Baranda (P. vulgaris L), # 209 (P. coccineus) y Tecuzi 1-74 (P. acutifolius), su análisis densitométrico, estos resultados se ilustran en la fig. 18. En la tabla No. 1, se muestra para las anteriores variedades el número de bandas o picos detectados por el densitómetro, así como la concentración relativa de cada banda y su porcentaje relativo en base al contenido total de proteínas. El trazo densitométrico para Bayo Baranda mostró cuatro principales picos, de los cuales la fracción 4 y 5 tienen muy semejante movilidad y otra semejanza es que son los más abundantes; el trazo del extracto salino de la semilla # 209, exhibió cinco principales picos, representando el 55.75% de las proteínas totales, el resto se repartió en diez pequeños picos; el trazo de Tecuzi 1-74, mostró 16 picos, de los cuales cuatro de ellos representaron el 47.57% del total de las proteínas. Los tres extractos mostraron dos picos o fracciones con movilidad electroforética muy similar y con la semejanza de que son las fracciones más concentradas, correspondiendo a la globulina G-1.

Antes de iniciar, los ensayos de susceptibilidad de

las proteínas contenidas en los extractos salinos totales, a la acción de las enzimas pepsina y tripsina, se procedió a verificar la actividad de estas enzimas, utilizando como sustrato hemoglobina. En el caso de la tripsina, la hemoglobina fue tratada previamente para desnaturalizarla como se indica en material y métodos. Los resultados de estos -- controles se muestran en las gráficas 2 y 3. También se -- analizó electroforéticamente los productos resultantes de la acción de la pepsina y la tripsina sobre la hemoglobina, estos resultados se presentan en la fig. 19 y 20. Para las pruebas de digestibilidad, también se escogió una semilla de cada una de las tres especies en estudio. sus extractos salinos totales fueron expuestos a la acción de la pepsina y tripsina, las condiciones de ensayo fueron idénticas a -- las usadas con la hemoglobina y analizando electroforéticamente los productos formados a distintos tiempos de incubación, resultados que se muestran en la fig. 21 a 26 respectivamente. Las proteínas nativas de los extractos salinos-totales, no fueron hidrolizadas en forma notoria, por ello se decidió desnaturalizarlas con calor y a distintos tiempos de incubación, para luego utilizarlas de nuevo como -- sustrato de las enzimas pepsina y tripsina. Para conocer el efecto de la desnaturalización sobre el comportamiento electroforético de las proteínas de los extractos, se realizaron los respectivos corrimientos electroforéticos controles. Se apreció durante la ebullición una notable precipitación, fenómeno que se evitó con la adición del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%, el cual también mejoró el corrimiento electroforético, al impedir la formación de agregados de alto peso molecular que se quedaban en la parte superior del gel separador, en la fig. 27- a 29 se muestra la separación electroforética de las pro--

teínas desnaturalizadas a diferentes tiempos de ebullición, en ausencia y presencia de SDS.

Inicialmente se había demostrado que para la extracción de las proteínas en frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ) no se requería de la adición del inhibidor de proteasas (PMSF), por lo que se consideró adecuado demostrar que durante el proceso de desnaturalización las proteínas de los extractos no son modificadas por alguna proteasa, para ello se realizó la desnaturalización en presencia del inhibidor PMSF sin SDS y con SDS, estos resultados se ilustran en la fig. 30 a 32.

Los corrimientos electroforéticos de los extractos de Bayo Baranda, # 209 y Tecuzi 1-74 desnaturalizados por ebullición a diferentes tiempos en presencia y ausencia -- del inhibidor PMSF, fueron idénticos, lo que excluye la posible acción de alguna proteasa durante el proceso.

Para estudiar la digestibilidad de las proteínas -- desnaturalizadas, los extractos salinos totales fueron -- puestos en un baño maría con agua en ebullición durante -- 120 min, en ausencia y presencia de SDS y sin la adición -- de PMSF. En la fig. 33 a 38 se muestran los corrimientos -- electroforéticos de los productos formados a diferentes -- tiempos de acción de la pepsina sobre las proteínas desnaturalizadas de los extractos de Bayo Baranda, # 209 y Tecuzi 1-74 observandose que en las tres variedades las proteínas de mayor peso molecular son las más resistentes a ser hidrolizadas. En forma similar se hicieron los ensayos para la digestibilidad con tripsina, estos resultados se -- ilustran en la fig. 39 a 44, respectivamente, donde se observa una mayor resistencia, incluyendo a las proteínas de menor peso molecular.

Para la obtención en la forma más pura posible, de cada una de las proteínas de reserva, se utilizó primeramente un método basado en las distintas solubilidades de las globulinas G1 y G2, inicialmente se logró un extracto con un medio con apreciable concentración de sales (NaCl - 0.5M - ácido ascórbico 0.25M -  $\text{NaN}_3$  0.02%) y subsecuentemente se fraccionó reduciendo su fuerza iónica, el esquema se exhibe en la fig. 7. También se efectuó la extracción de la globulina G2, obteniendo el extracto inicial con un medio relativamente pobre en sales (NaCl 0.06M - ácido ascórbico 0.25M -  $\text{NaN}_3$  0.02%) y posteriormente reduciendo aún más su fuerza iónica, fig. 8. Las distintas fracciones de estos esquemas de purificación se analizaron electroforéticamente, en la fig. 45 se muestran los resultados obtenidos con las variedades Bayo Baranda (P. vulgaris L.), # 209 (P. coccineus) y Tecuzi 1-74 (P. acutifolius).

Posteriormente se intentó una mayor purificación de las globulinas G1 y G2. Los extractos obtenidos por sus diferentes solubilidades como lo marcan los esquemas de la fig. 7 y 8, fueron filtrados a través de una columna cromatográfica de vidrio empacada con Ultrogel AcA-34, la cual fue previamente empacada y equilibrada con el mismo amortiguador (NaCl 0.5M -  $\text{NaN}_3$  0.02%) en que se encuentran resuspendidos los extractos por purificar. Los perfiles de elución de las globulinas G1 y G2 se muestran en la fig. 46 a 51. Se seleccionaron las fracciones con mayor contenido de proteínas, se concentraron por ultrafiltración y se analizaron electroforéticamente, estos resultados se ilustran en la fig. 52 a 54, respectivamente. Observándose que las fracciones con mayor contenido de proteínas fue la F - II para las variedades Bayo Baranda, # 209 y Tecuzi 1-74,-

que en el corrimiento electroforético corresponden a las globulinas G1 y G2.

Con el fin de estimar el peso molecular de las subunidades de las globulinas G1 y G2 purificadas, se realizó un corrimiento electroforético utilizando como referencias las siguientes proteínas de peso molecular conocido: Mioglobina, 17,200; Inhibidor de tripsina, 21,000; DNAasa I, 34,000; Albúmina de huevo, 45,000. En la fig. 55, se muestra una fotografía del gel con los anteriores resultados. A cada una de las proteínas y subunidades se le calculó -- su movilidad relativa con respecto a la del colorante azul de bromofenol. Al graficar el logaritmo del peso molecular de cada una de las proteínas de referencia versus su movilidad relativa, se obtuvo la gráfica 4, en la cual se puede interpolar la movilidad relativa de las distintas subunidades problema y así conocer su peso molecular, encontrándose un peso molecular para G1 de 150,000 daltones para Bayo Baranda, # 209 y Tecuzi 1-74. Para G2 un peso molecular de 61,000 daltones para Bayo Baranda y # 209, y de 58,000 daltones para Tecuzi 1-74.

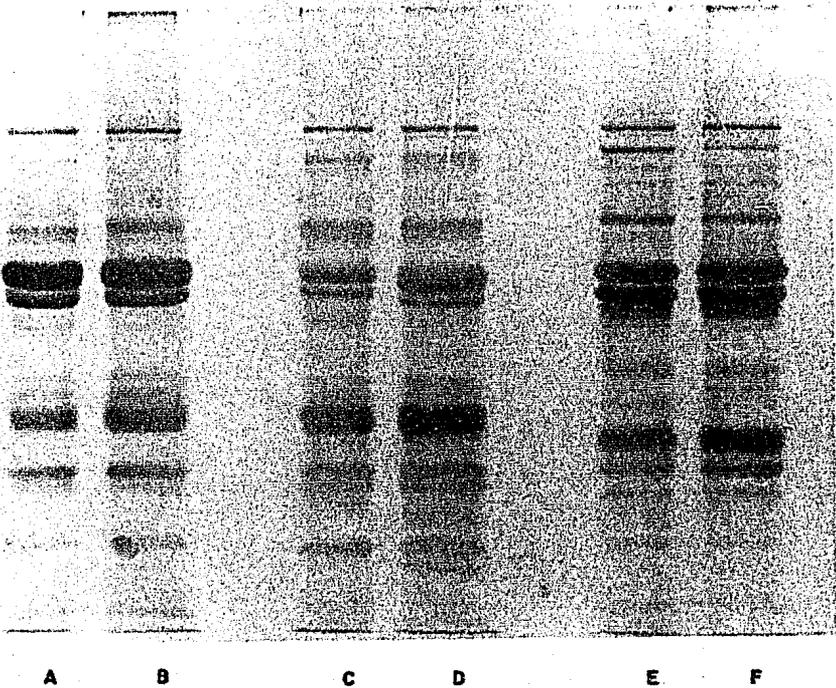


Fig. 9. Separación electroforética de la Extracción de Proteínas en presencia de un Inhibidor de Proteasas -- (PMSF). A: EST (sin PMSF) de Bayo Baranda (Phaseolus vulgaris L.); B: EST (con PMSF) de Bayo Baranda; C: EST --- (sin PMSF) de # 209 (Phaseolus coccineus); D: EST (con-- PMSF) de # 209; E: EST (sin PMSF) de Tecuzi 1-74 (Phaseolus acutifolius); F: EST (con PMSF) de Tecuzi 1-74 . 60 mg de proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

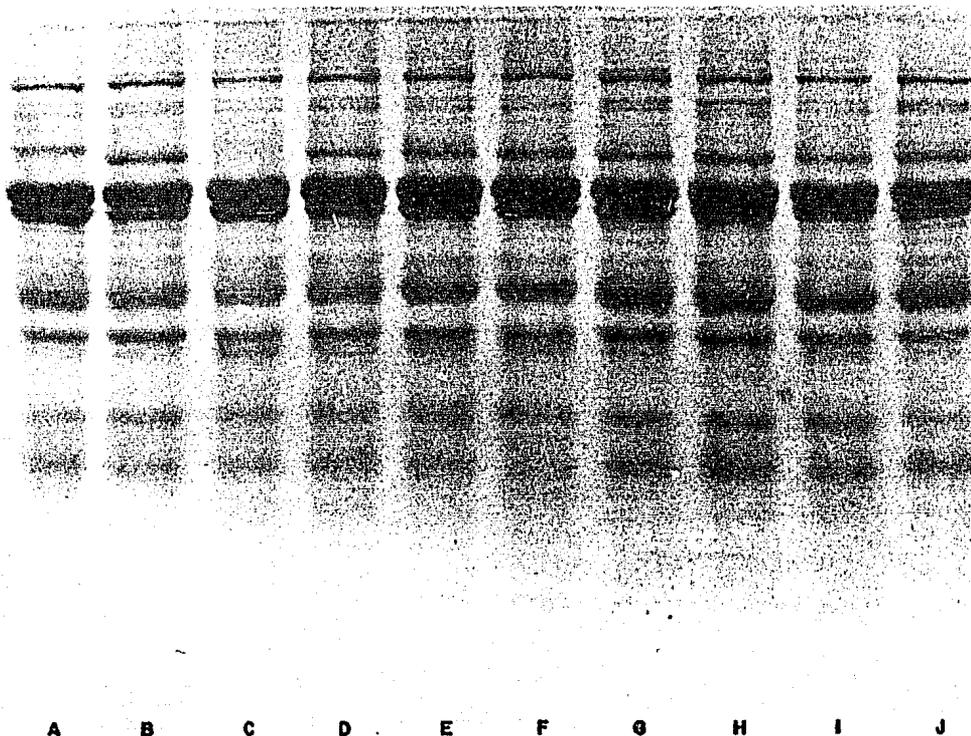
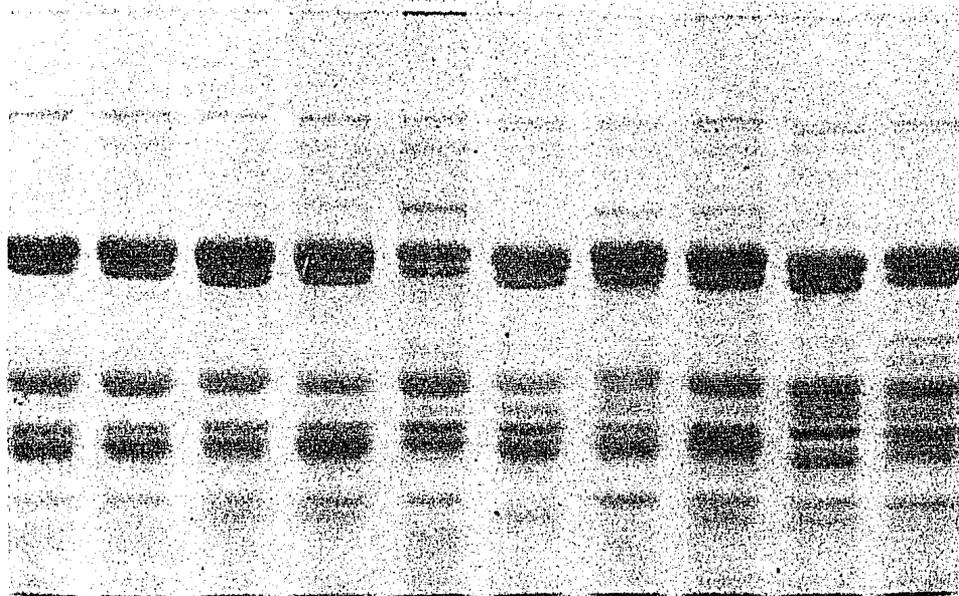


Fig. 10. Separación electroforética de las Proteínas de los Extractos Salinos Totales de Phaseolus vulgaris L. - A: Bayo los Llanos; B: Pinto Nacional; C: Río Grande; -- D: Bayo Baranda; E: Bayo Madero; F: Ojo fr Cabra; G: Bayo Criollo el llano ; H: Bayo Rata; I: Flor de Mayo; J:- Bayo Durango. 60 mg de proteína por pozo. Tinción con -- azul brillante de Coomassie R-250.



A      B      C      D      E      F      G      H      I      J

Fig. 11. Separación electroforética de las Proteínas de los Extractos Salinos Totales de Phaseolus coccineus. -- A: # 27; B: # 60; C: # 202; D: # 208; E: # 209; F: # 222; G: # 249; H: # 264; I: # 265; J: # 276. 60 Mg proteína - por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

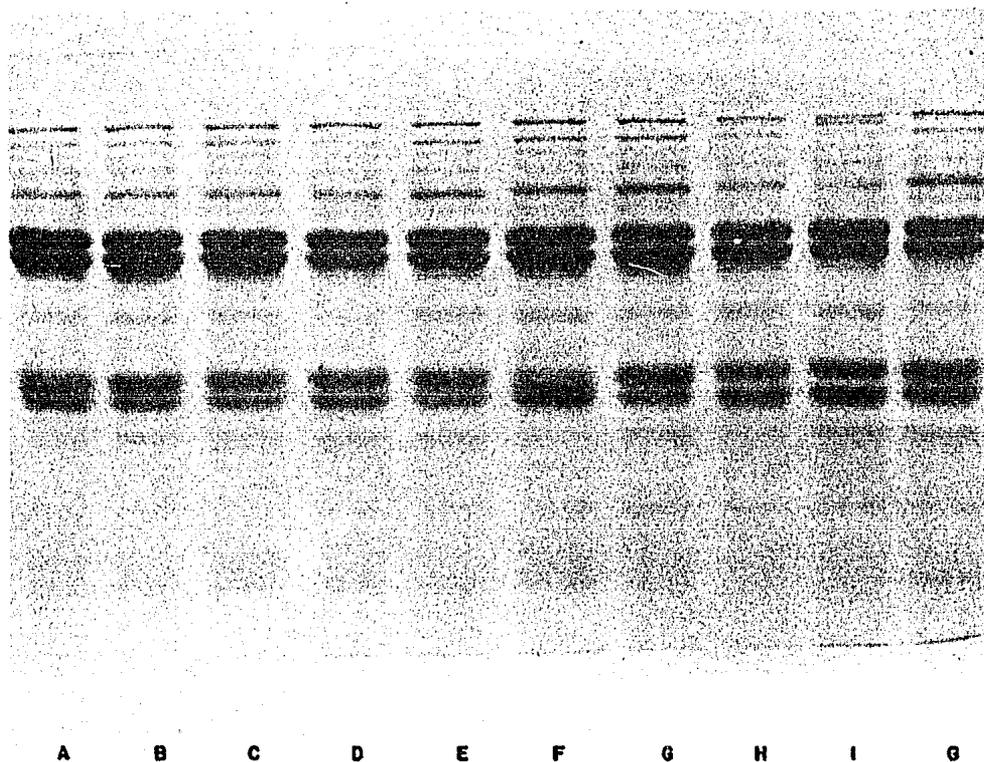
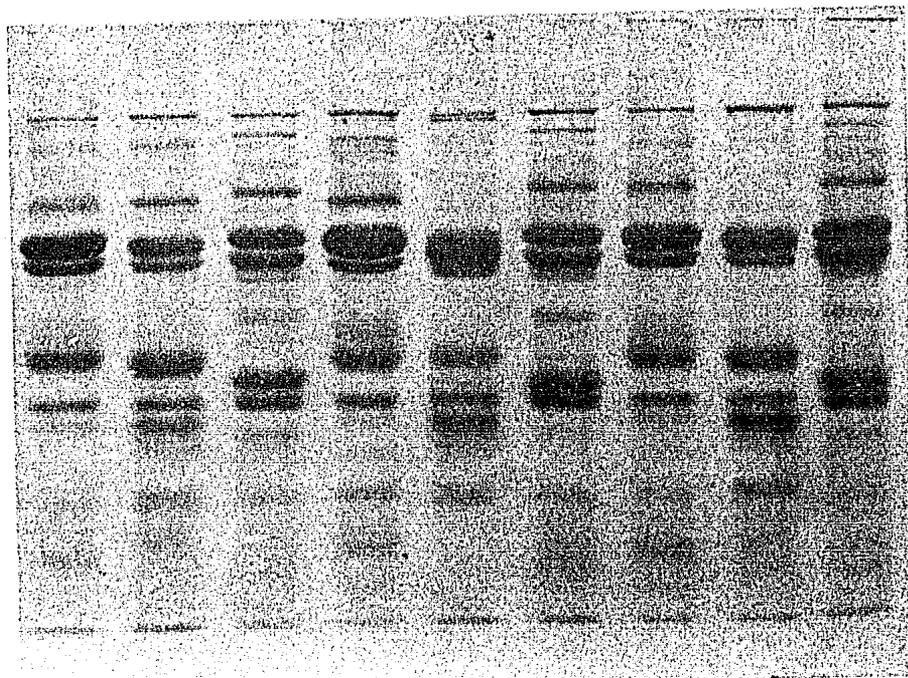
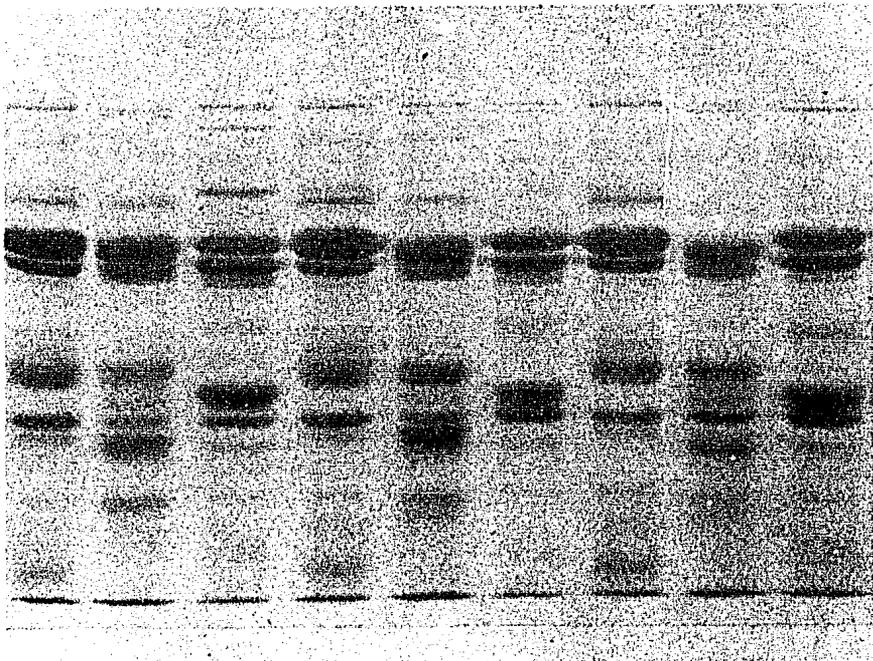


Fig. 12. Separación electroforética de las Proteínas de los Extractos Salinos Totales de Phaseolus acutifolius. A: Tecuzi 29; B: Tecuzi 72; C: Tecuzi 1-74; D: Raramuri-26; E: Raramuri 27; F: Cuencamé; G: P.I. 239056; H: P.I. 231638; I: P.I. 321638; J: P.I. 319551. 60 mg proteína - por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.



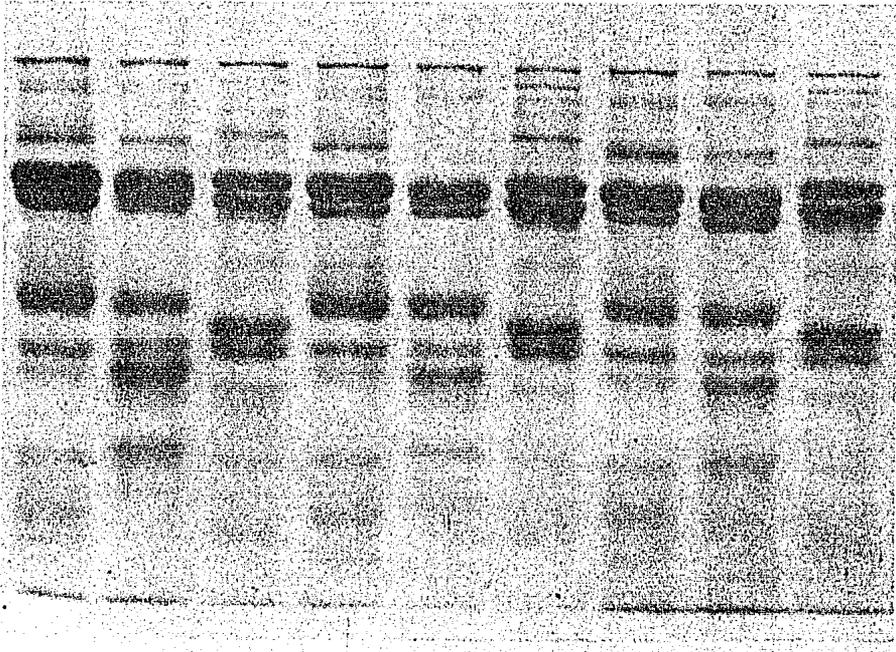
A B C D E F G H I

Fig. 13. Separación electroforética de las Proteínas de Extractos Salinos Totales Alternados de las especies Phaseolus vulgaris L., Phaseolus coccineus y Phaseolus acutifolius. A: Río Grande; B: # 209; C: Raramuri 27; D: Bayo Criollo el llano; E: # 222; F: Cuencamé; G: Bayo los Llanos; H: # 27; I: Tecuzi 29. 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

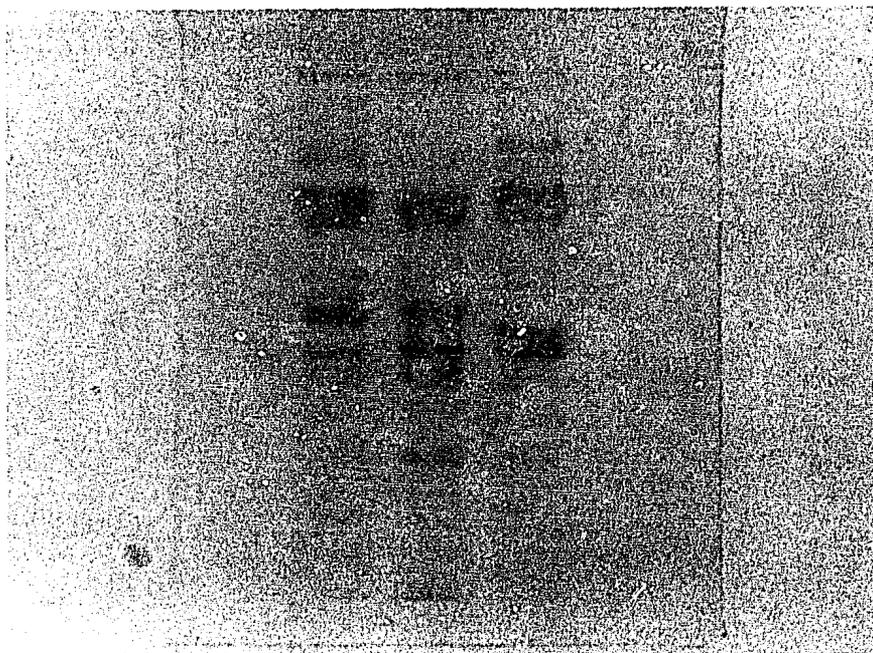


A B C D E F G H I

Fig. 14. Separación electroforética de las Proteínas de Extractos Salinos Totales Alternados de las especies Phaseolus vulgaris L., Phaseolus coccineus y Phaseolus acutifolius. A: Pinto Nacional; B: # 249; C: P.I. 239056; D: Bayo Rata; E: # 264; F: P.I. 231638; G: Flor de Mayo; H: # 265; I: P.I. 321638. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250. 60 Mg proteína por pozo.



A B C D E F G H I  
Fig. 15. Separación electroforética de las Proteínas de los Extractos Salinos Totales Alternados de las especies Phaseolus vulgaris L., Phaseolus coccineus y Phaseolus acutifolius. A: Bayo Madero; B: # 208; C: Raramuri 26; - D: Ojo de Cabra; E: # 60; F: Tecuzi 72; G: Bayo Baranda; H: # 202; I: Tecuzi 1-74. 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.



A B C

Fig. 16. Separación electroforética de las Proteínas de Extractos Salinos Totales Alternados de las especies --- Phaseolus vulgaris L., Phaseolus coccineus y Phaseolus acutifolius. A: Bayo Durango; B: # 276; C: P.I. 319551. 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie.

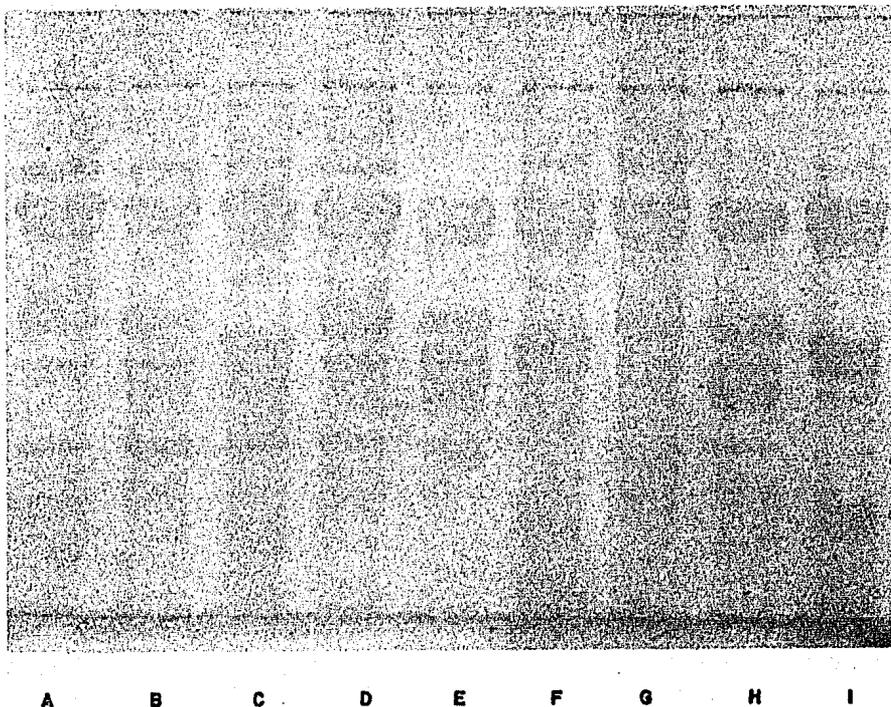


Fig. 17. Separación electroforética de las Proteínas de Extractos Salinos Totales Alternados de las especies -- Phaseolus vulgaris L., Phaseolus coccineus y Phaseolus acutifolius. A: Río Grande; B: # 209; C: Raramuri 27 ; - D: Bayo Criollo el llano; E: # 222; F: Cuencamé; G: Bayo los Llanos; H: # 27; I: Tecuzi 29. 60 mg proteína por po zo. Tinción para grupos sulfhidrilos.

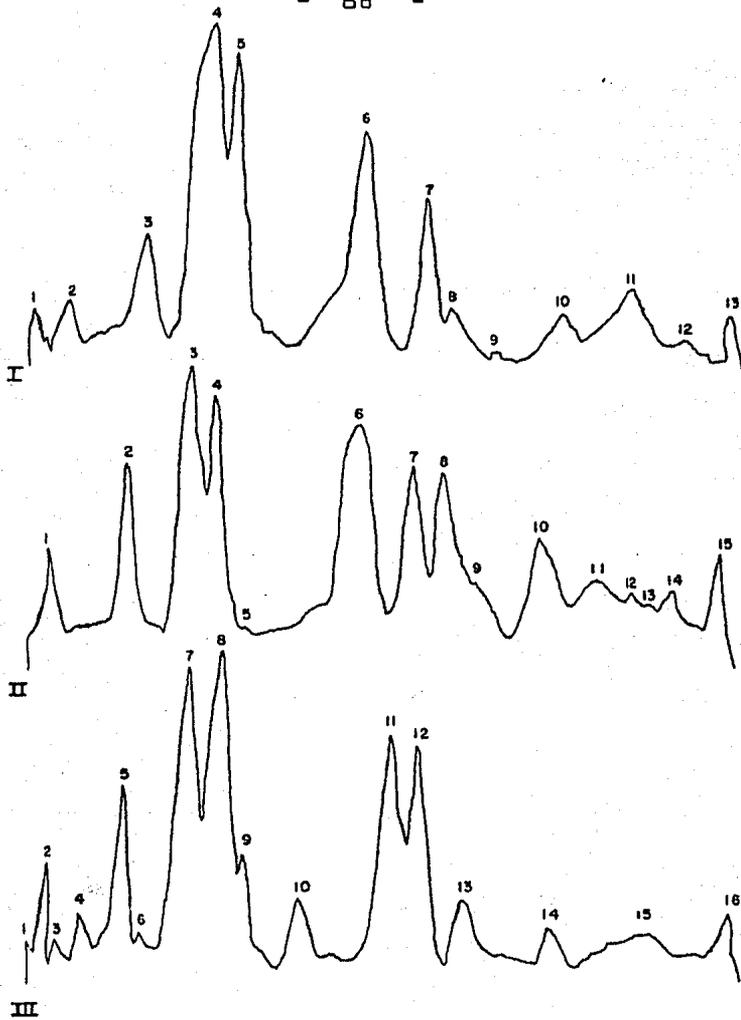
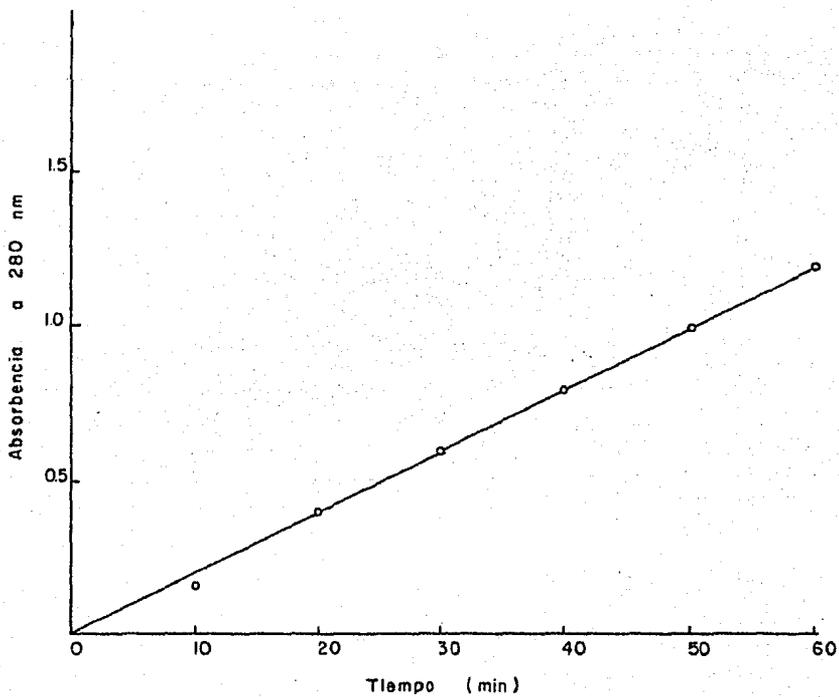


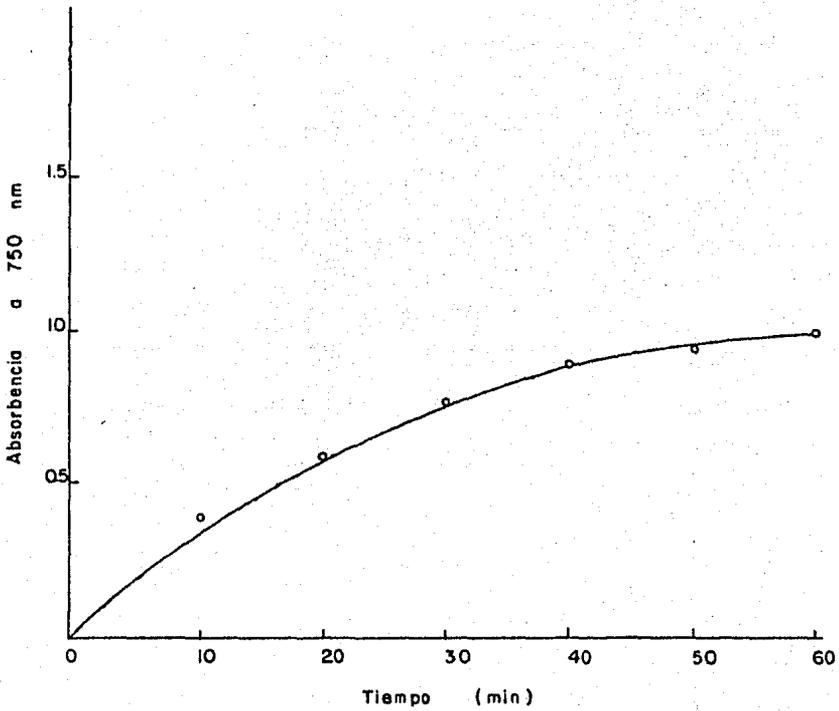
Fig. 18. Análisis densitométrico de Extractos Salinos Totales. I: Bayo Baranda (P. vulgaris L.); II: # 209 (P. coccineus); III: Tecuzi 1-74 (P. acutifolius). Las muestras se analizaron a una longitud de onda de 590 m $\mu$ ., longitud de barrido de 80 m $\mu$ ., rango de densidad óptica de 1.0 y auto ganancia del 75%.

Pico	<u>P. vulgaris L.</u> I Bayo Baranda Conc. Total 17.16 mg/ml		<u>P. coccineus</u> II # 209 Conc. Total 13.95 mg/ml		<u>P. acutifolius</u> III Tecuzi 1-74 Conc. Total 20.13 mg/ml	
	%	Conc. relativa	%	Conc. relativa	%	Conc. relativa
1	1.16	0.19	4.39	0.61	0.34	0.06
2	3.77	0.64	10.64	1.47	2.25	0.45
3	9.82	1.66	14.02	1.95	1.14	0.22
4	26.21	4.49	6.90	0.96	2.55	0.51
5	12.25	2.10	0.87	0.12	7.00	1.40
6	19.93	3.42	20.10	2.80	1.38	0.21
7	7.41	1.28	7.61	1.06	18.19	3.66
8	3.00	0.51	8.12	1.21	15.65	3.15
9	0.24	0.04	2.69	0.31	3.38	0.68
10	4.26	0.13	8.40	1.11	4.10	0.94
11	8.18	1.50	5.83	0.81	19.28	3.01
12	1.63	0.21	1.37	0.19	8.45	1.70
13	1.41	0.25	0.74	0.10	4.82	0.91
14			4.20	0.58	4.05	0.81
15			3.50	0.48	7.25	1.45
16					3.59	0.12

Tabla No. 1.- Análisis densitométrico de los extractos salinos totales.



Gráfica 2.- Hidrólisis de la hemoglobina, por la pepsina- a diferentes tiempos de incubación.



Gráfica 3.- Hidrólisis de la hemoglobina, por tripsina a diferentes tiempos de incubación.

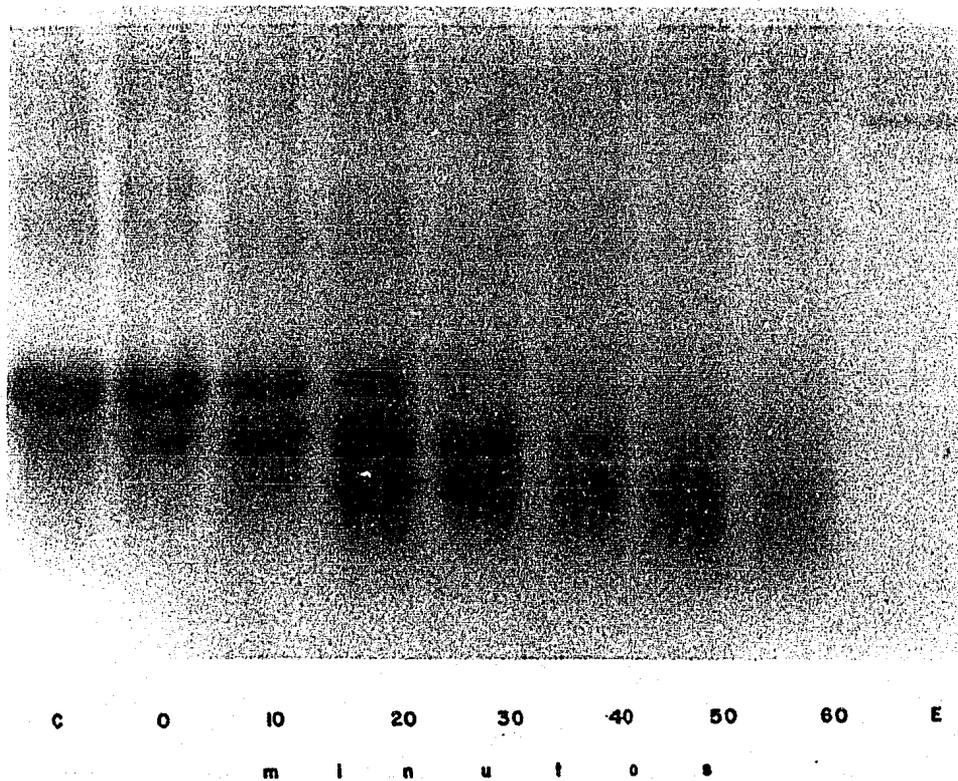


Fig. 19. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de la pepsina utilizando como sustrato Hemoglobina. C: Hemoglobina; E: Pepsina. 60  $\mu$ g proteína por --pozo. Gel de acrilamida al 13 %. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

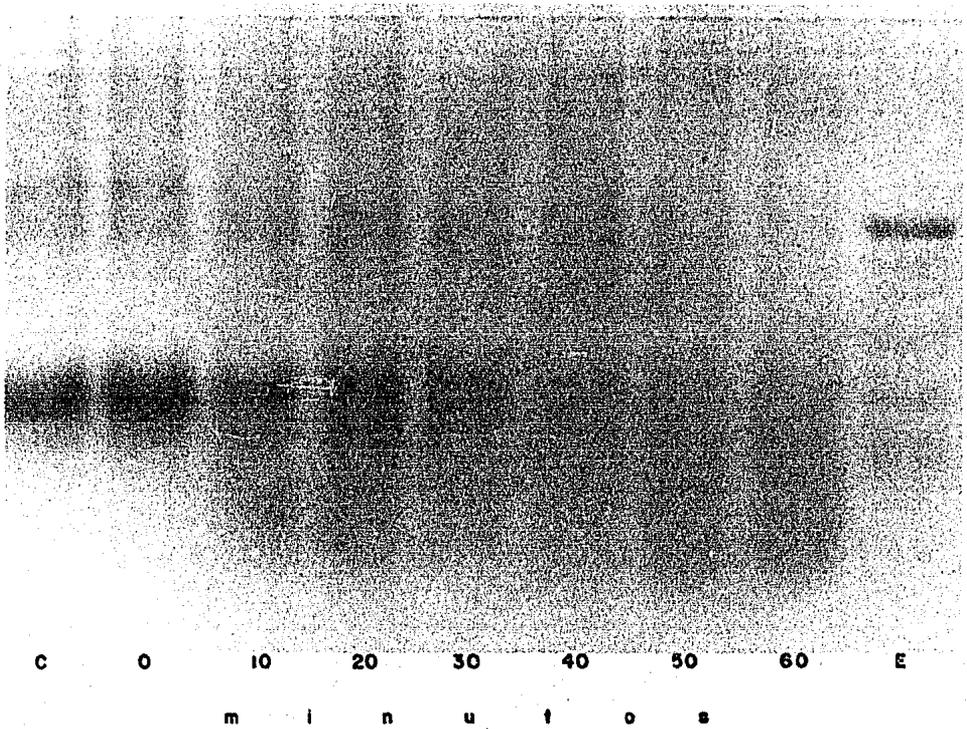


Fig. 20. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de tripsina utilizando como sustrato Hemo--globina. C: Hemoglobina; E: Tripsina. 60  $\mu$ g proteína por -pozo. Gel de acrilamida al 13%. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

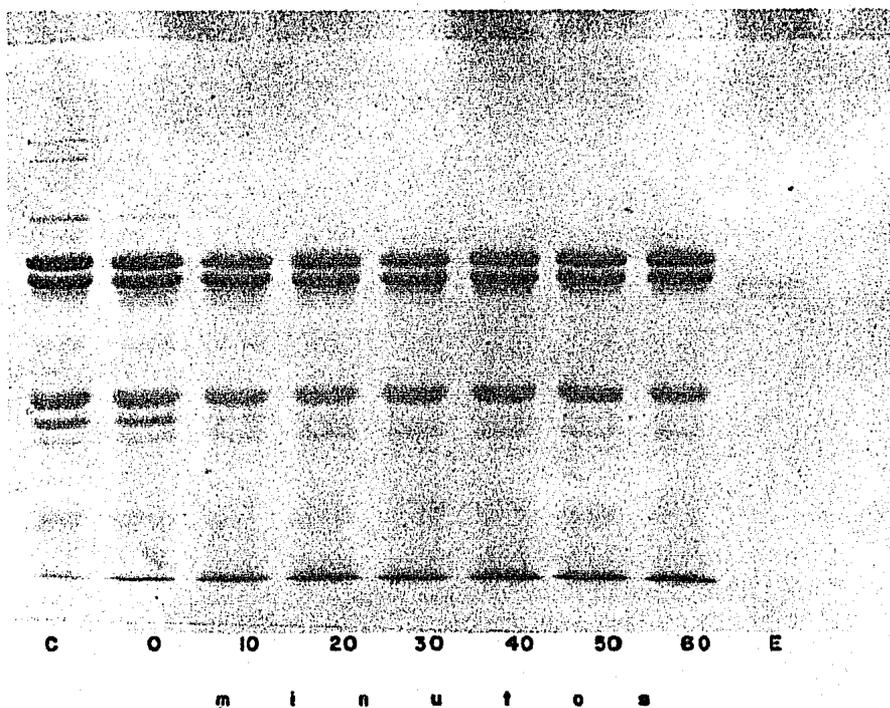


Fig. 21. Análisis electroforético de los productos formados por acción de la pepsina sobre las proteínas nativas de un extracto salino total de Bayo Baranda (*P. vulgaris* L.). C: extracto salino total; E: Pepsina. 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

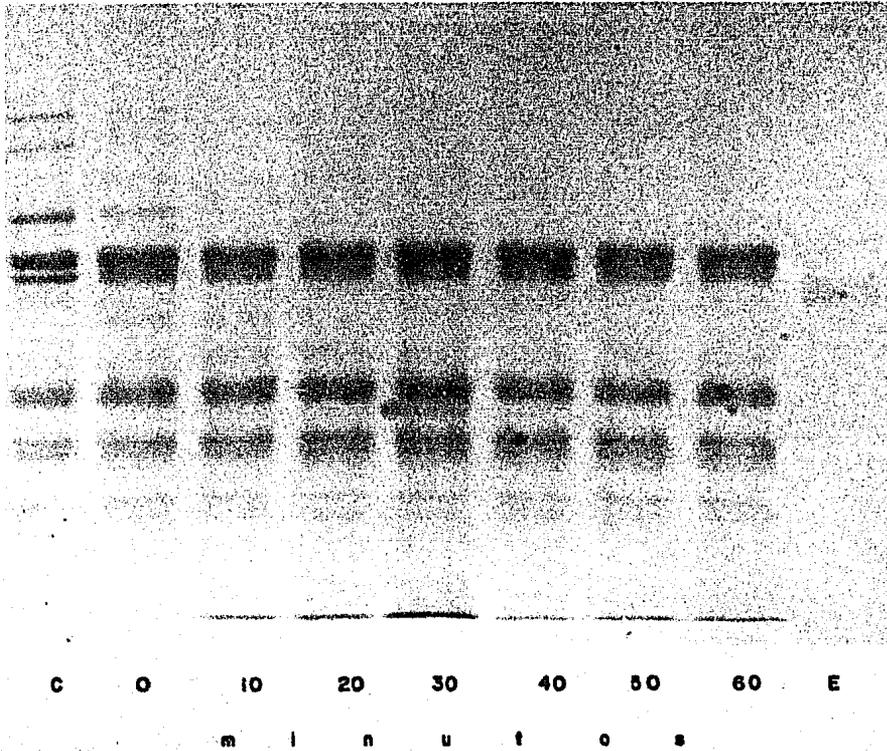


Fig. 22. Análisis electroforético de los productos formados por acción de la pepsina sobre las proteínas nativas de un extracto salino total de # 209 (*P. coccineus*). C: extracto salino total; E: Pepsina. 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

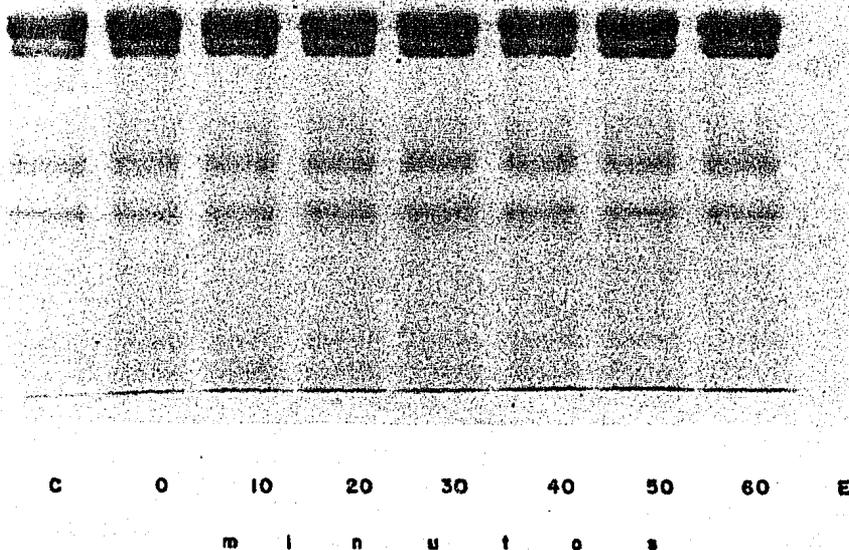


Fig. 23. Análisis electroforético de los productos formados por acción de la pepsina sobre las proteínas nativas de un extracto salino total de Tecuzi 1-74 (P. acutifolius). C:- extracto salino total; E: Pepsina. 60 µg. proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

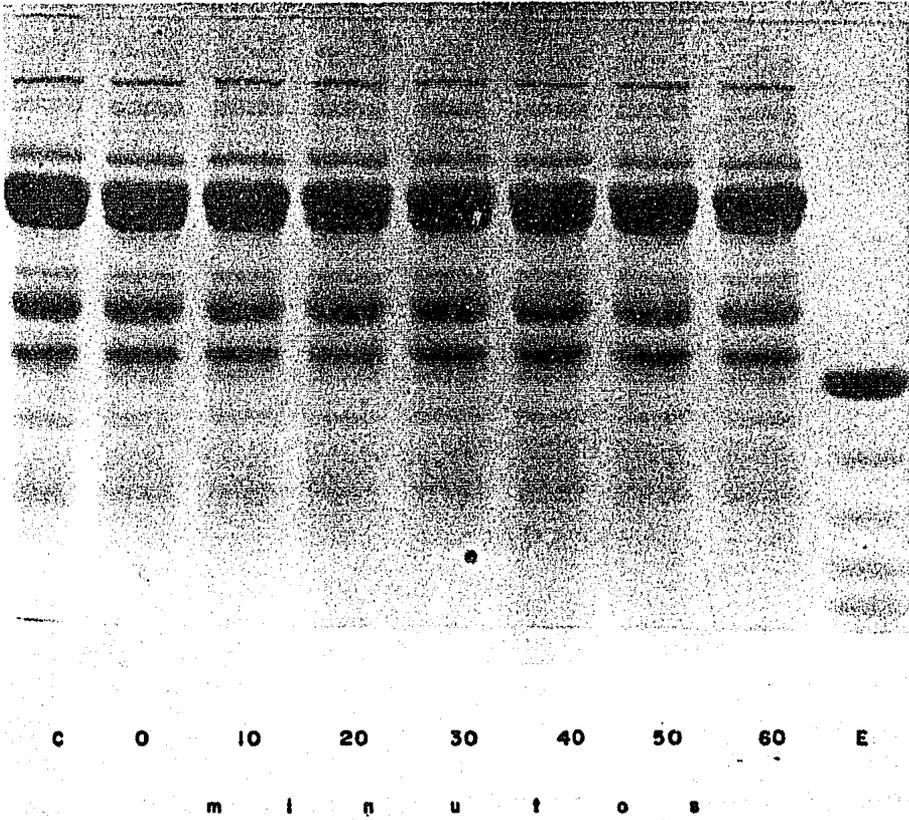


Fig. 24. Análisis electroforético de los productos formados por acción de tripsina sobre las proteínas nativas de un extracto salino total de Bayo Baranda (*P. vulgaris* L.). C: extracto salino total; E: Tripsina. 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

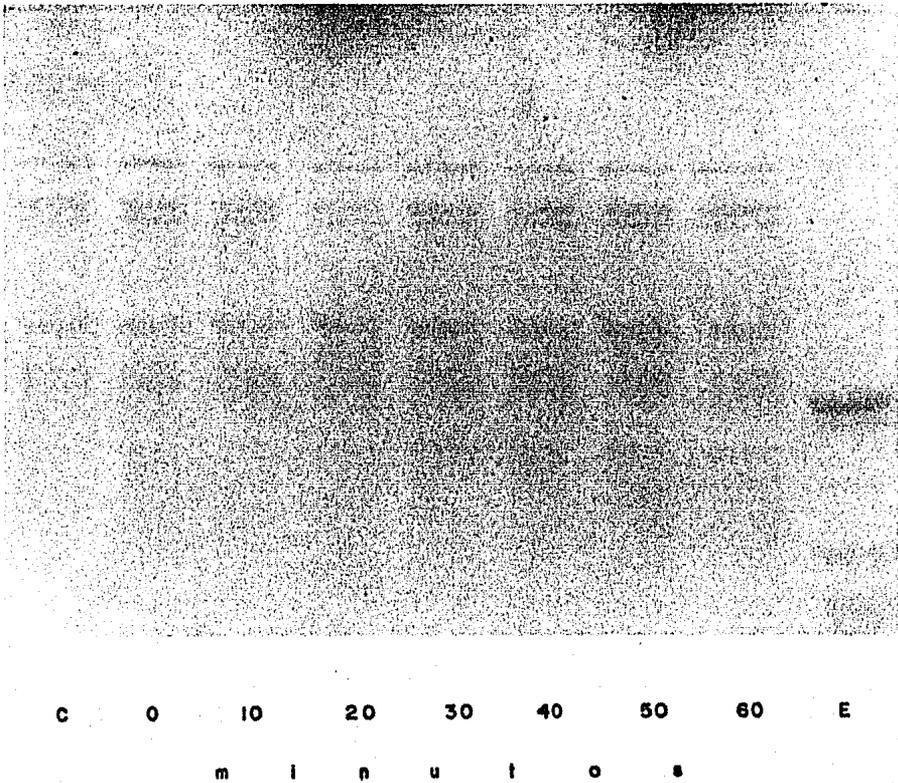


Fig. 25. Análisis electroforético de los productos formados por acción de tripsina sobre las proteínas nativas de un extracto salino total de # 209 (P. coccineus). C: extracto salino total; E: Tripsina. 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

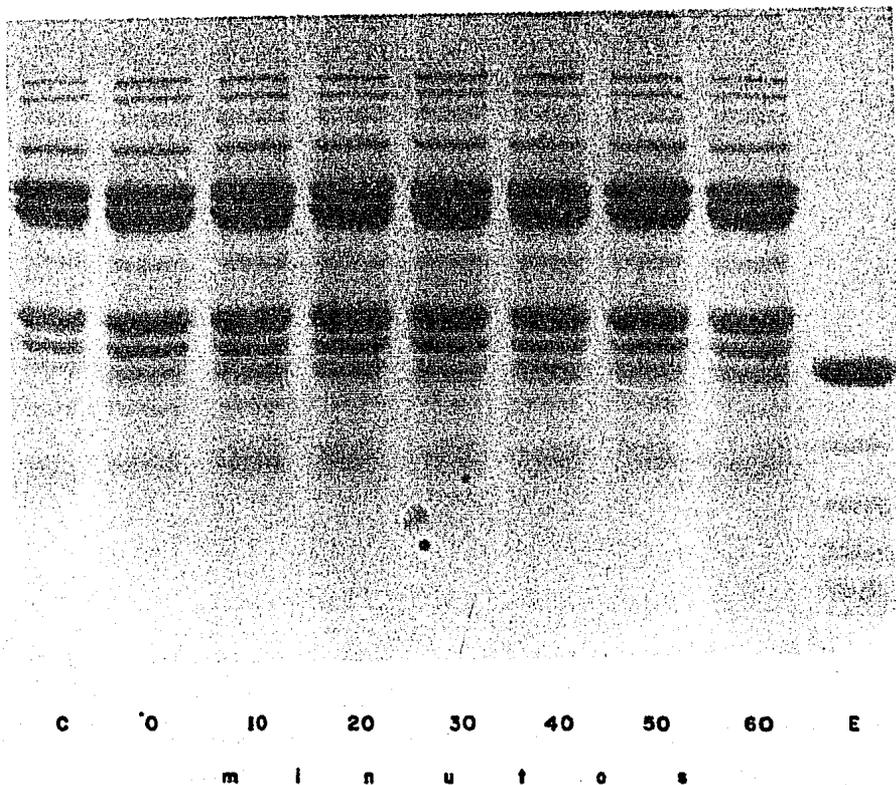


Fig. 26. Análisis electroforético de los productos formados por acción de tripsina sobre las proteínas nativas de un extracto salino total de Tecuzi 1-74 (*P. acutifolius*). C: extracto salino total; E: Tripsina. 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

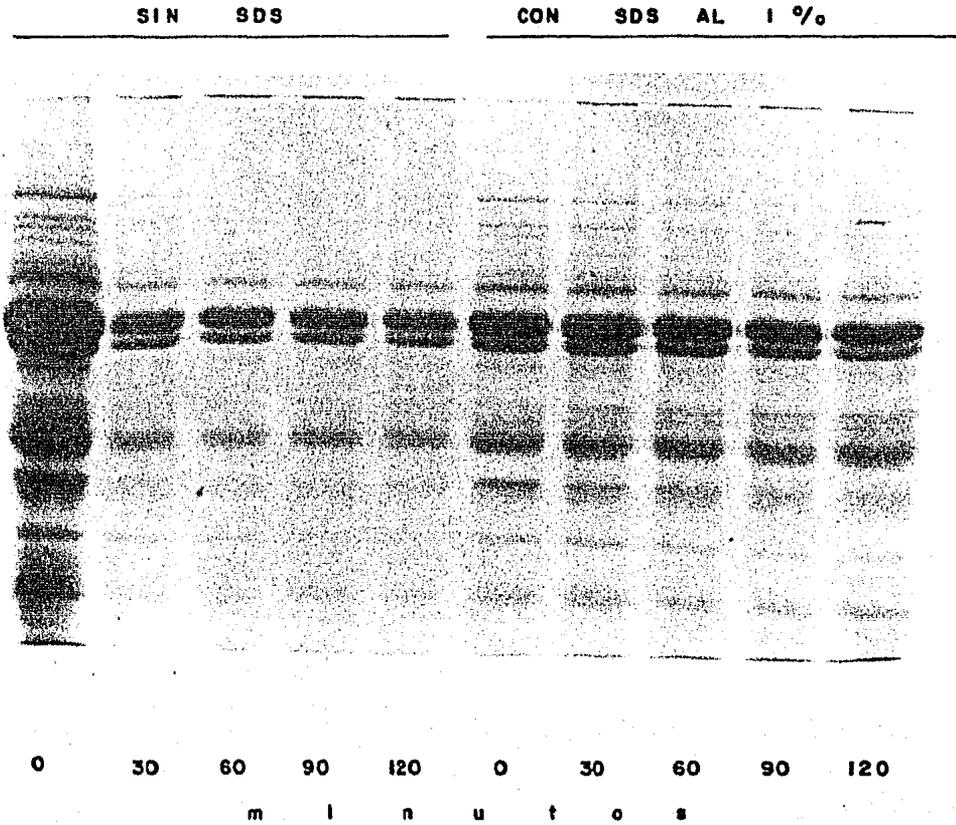


Fig. 27. Separación electroforética de las proteínas desnaturalizadas con ebullición a diferentes tiempos en ausencia y presencia del detergente SDS, de extracto salino total de Bayo Baranda (*P. vulgaris* L.). 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

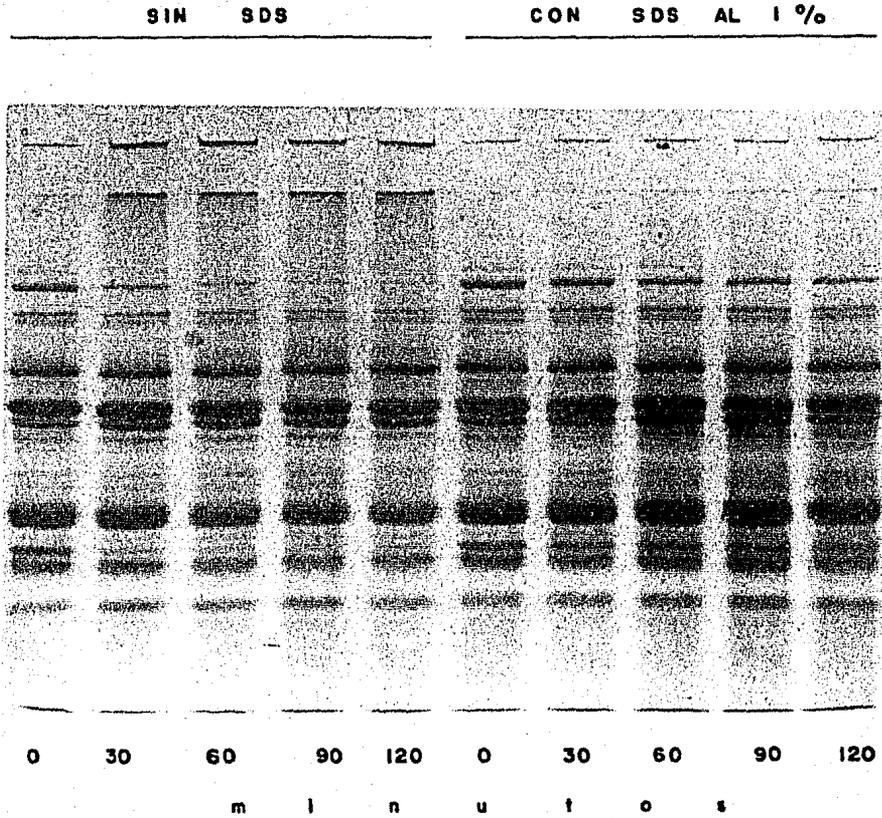


Fig. 28. Separación electroforética de las proteínas desnaturalizadas con ebullición a diferentes tiempos en ausencia y presencia del detergente SDS, de extracto salino total de # 209 (*P. coccineus*). 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

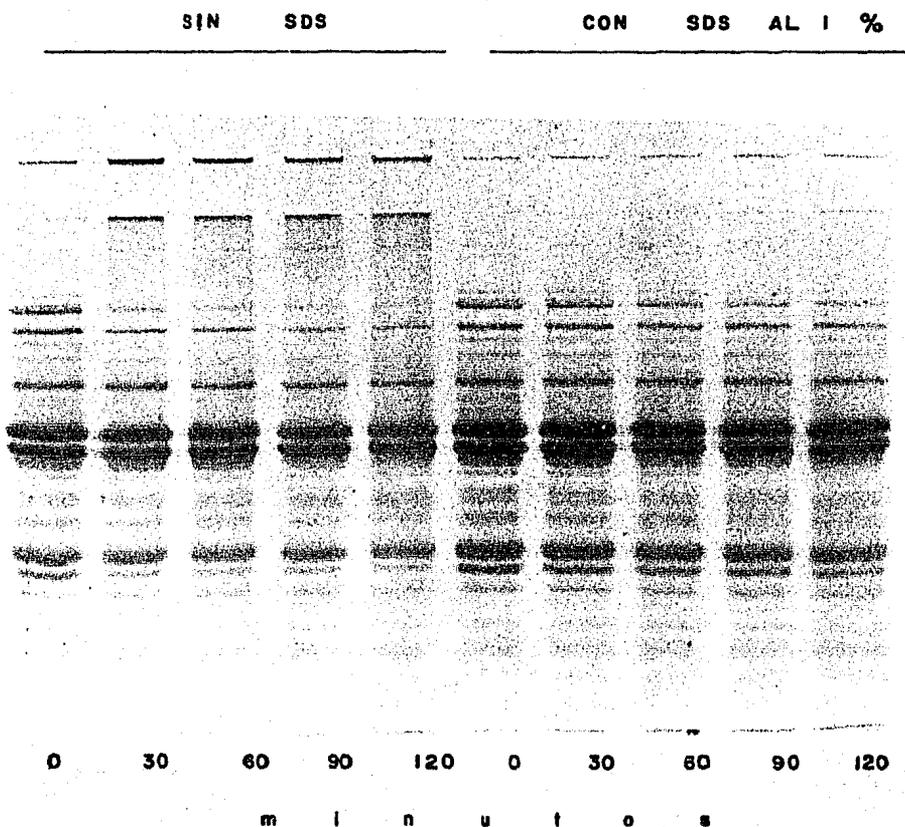


Fig. 29. Separación electroforética de las proteínas desnaturalizadas con ebullición a diferentes tiempos en ausencia y presencia del detergente SDS, del extracto salino total de Tecuzi 1-74 (P. acutifolius). 60 mg proteína por pozo. - Tinción con azul brillante de Coomassie r-250.

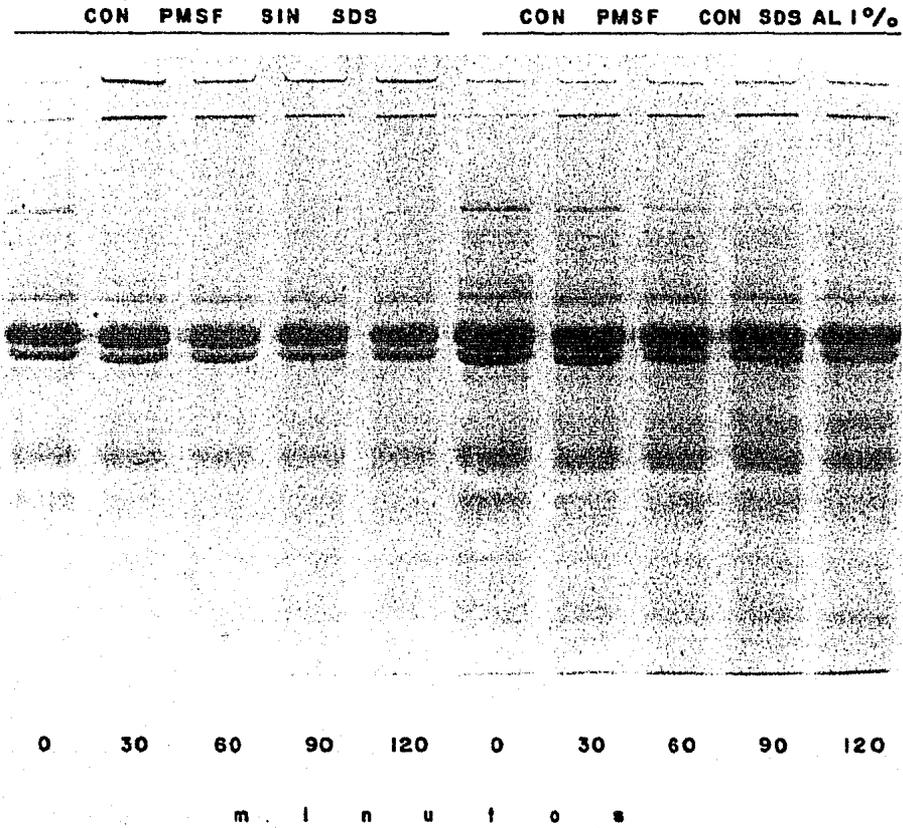


Fig. 30. Separación electroforética de las proteínas desnaturalizadas por ebullición a diferentes tiempos en presencia del inhibidor de proteasas PMFS, sin y con SDS del extracto salino total de Bayo Baranda (*P. vulgaris* L.). 60 - mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

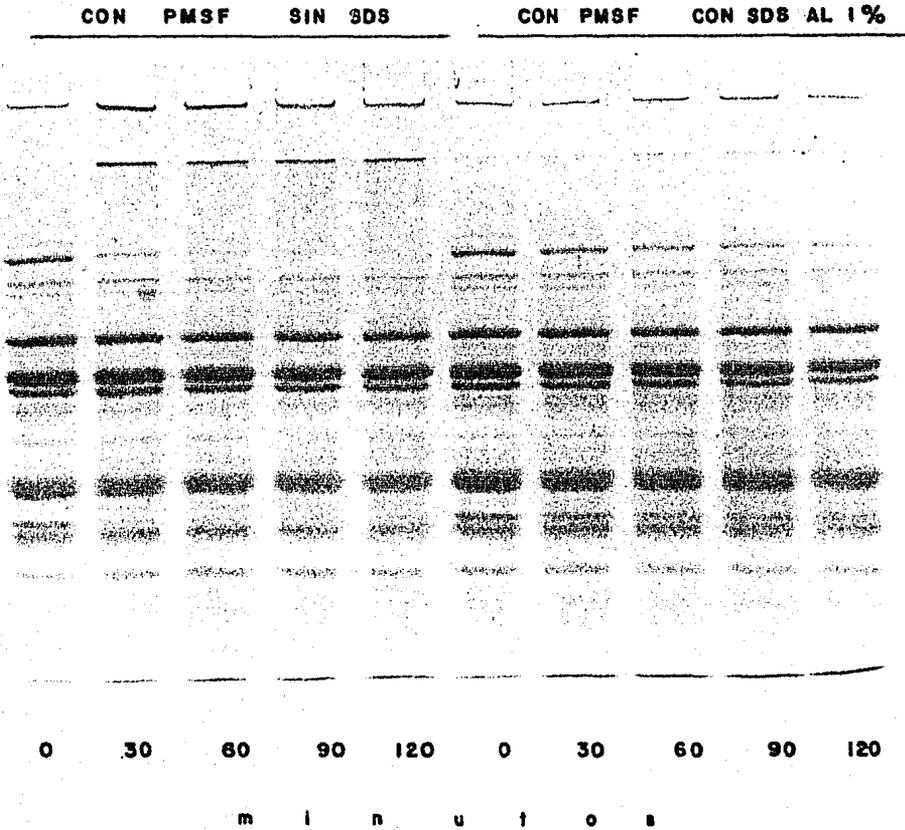


Fig. 31. Separación electroforética de las proteínas desnaturalizadas por ebullición a diferentes tiempos en presencia del inhibidor de proteasas PMFS, sin y con SDS del extracto salino total de # 209 (*P. coccineus*). 60 Mg protefina por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

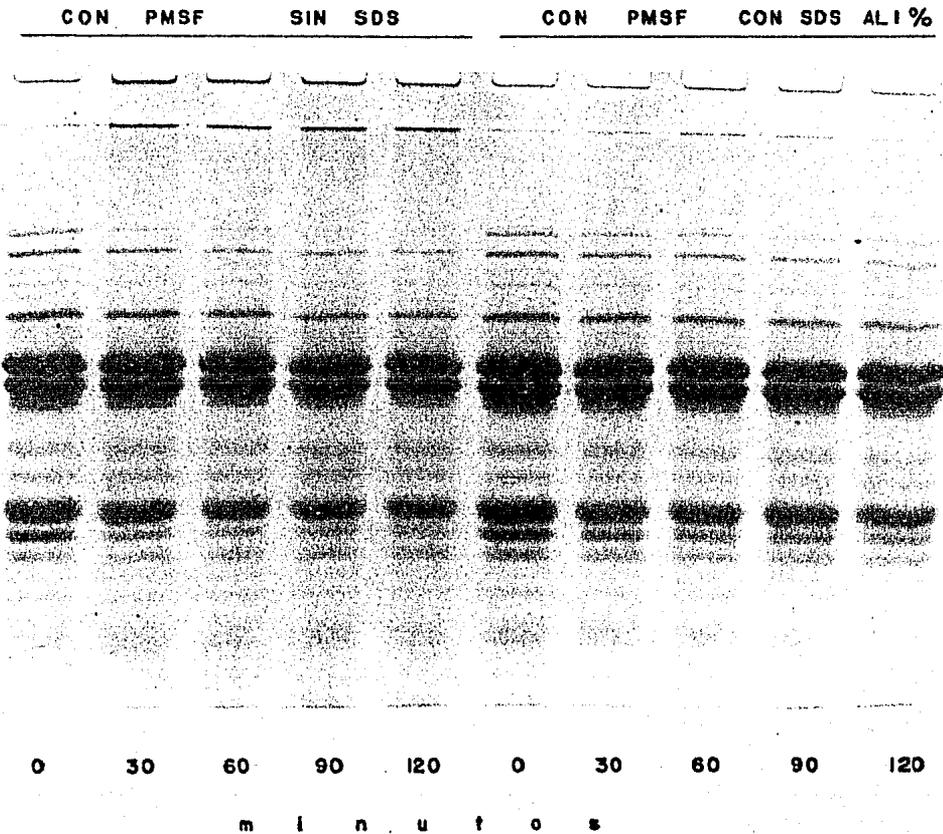


Fig. 32. Separación electroforética de las proteínas desnaturalizadas por ebullición a diferentes tiempos en presencia del inhibidor de proteasas PMFS, sin y con SDS del extracto salino total de Tecuzi 1-74 (*P. acutifolius*). 60 Mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

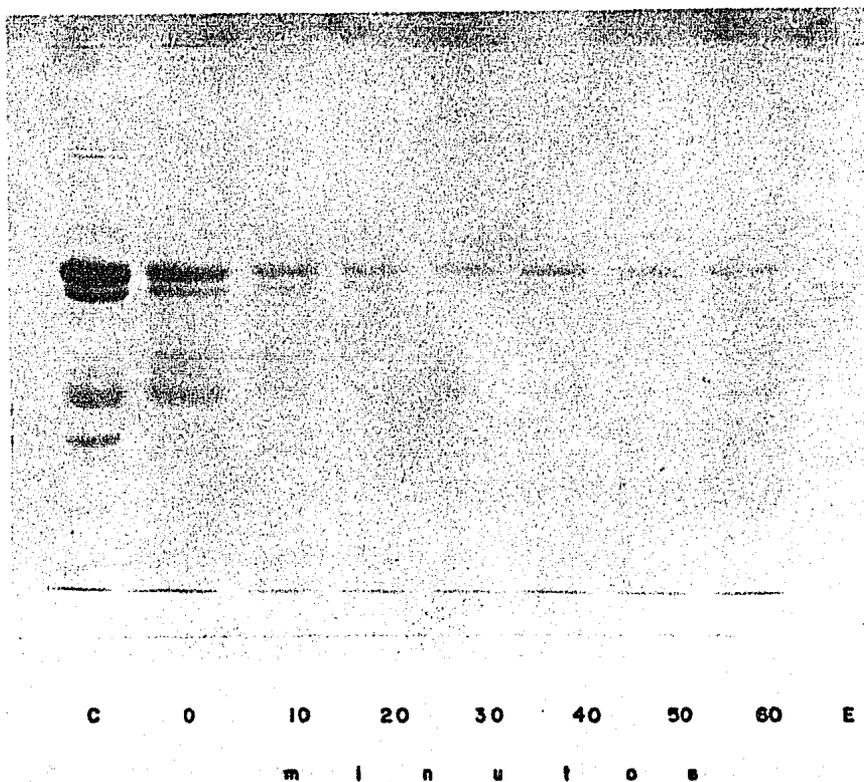


Fig. 33. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de la pepsina, sobre las proteínas desnaturadas por ebullición durante 120 min, del extracto salino total de Bayo Baranda (*P. vulgaris* L.). C: extracto salino total; E: Pepsina. 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

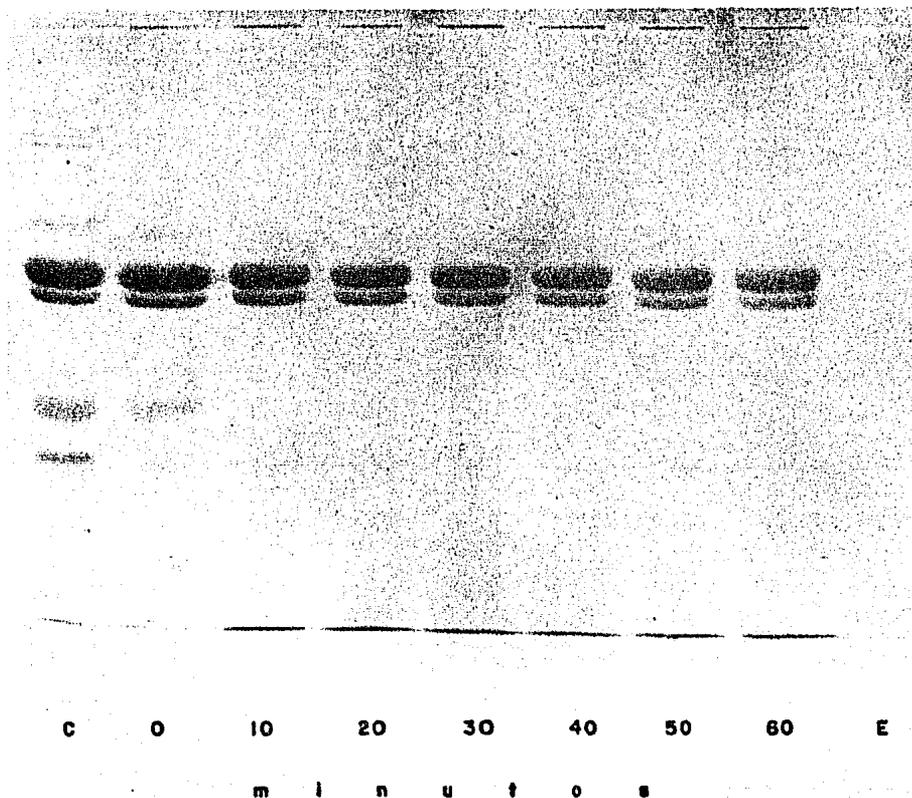


Fig. 34. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de la pepsina, sobre las proteínas desnaturadas por ebullición durante 120 min, en presencia del - detergente SDS, del extracto salino total de Bayo Baranda- (*P. vulgaris* L.). C: extracto salino total; E: Pepsina. -- 60 Mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

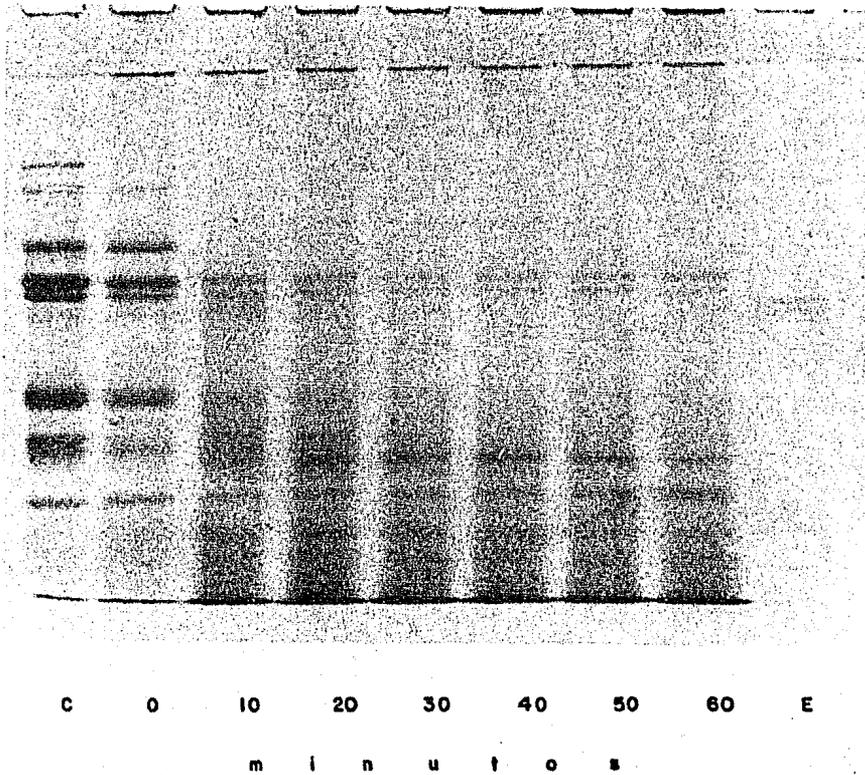
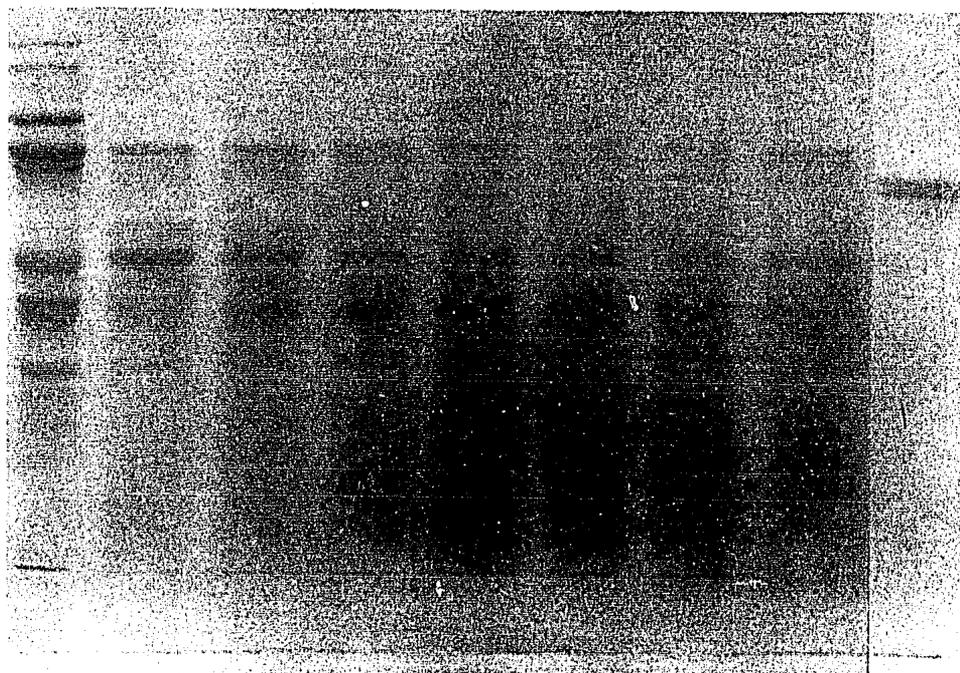


Fig. 35. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de la pepsina, sobre las proteínas desnaturalizadas por ebullición durante 120 min, del extracto salino total de # 209 (P. coccineus), C: extracto salino total; E: Pepsina. 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.



C 0 10 20 30 40 50 60 E  
m i n u t o s

Fig. 36. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de la pepsina, sobre las proteínas desnaturadas por ebullición durante 120 min, en presencia del detergente SDS, del extracto salino total de # 209 (P. coccineus). C: extracto salino total; E: Pepsina. 60 Mg -- proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

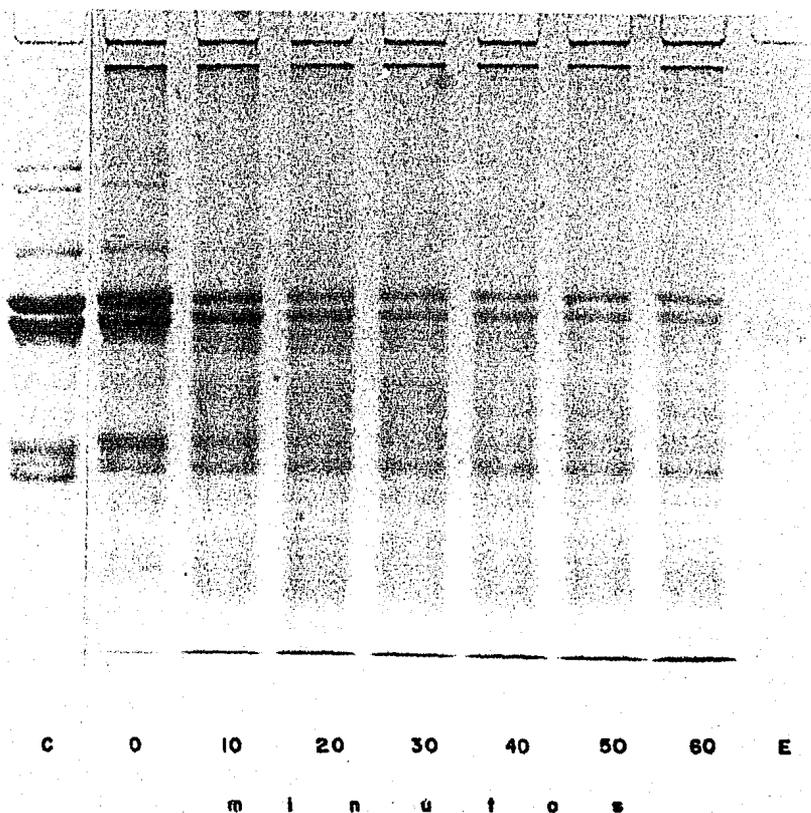


Fig. 37. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de la pepsina, sobre las proteínas desnaturadas por ebullición durante 120 min, del extracto salino total de Tecuzi 1-74 (P. acutifolius), C: extracto salino total; E: Pepsina. 60 Mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

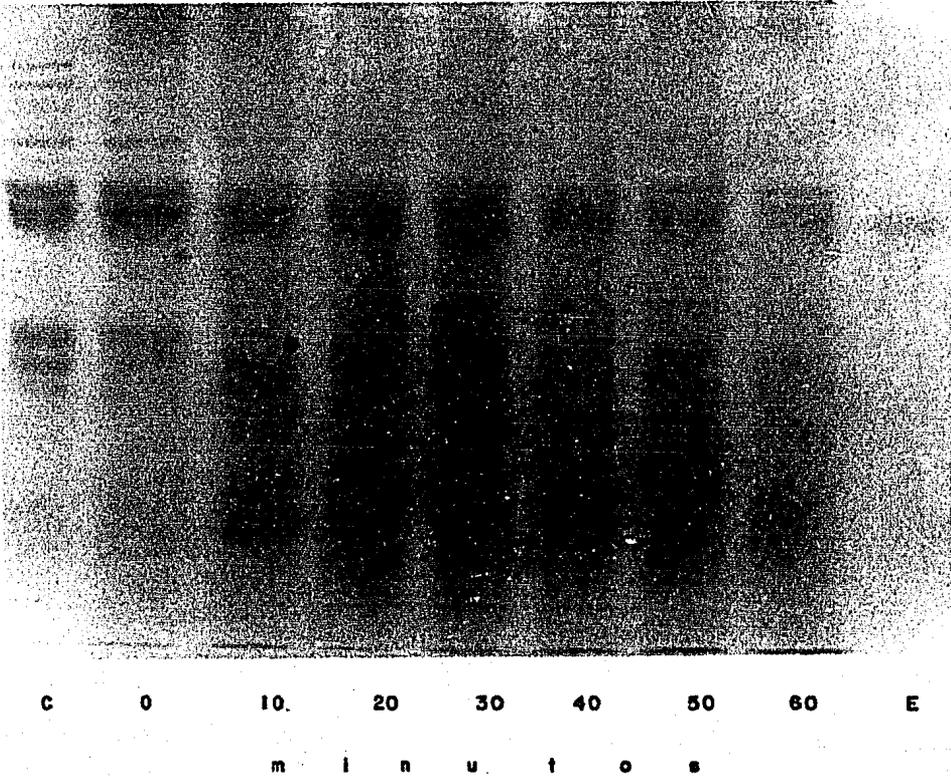


Fig. 38. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de la pepsina, sobre las proteínas desnaturadas por ebullición durante 120 min, en presencia del - detergente SDS, del extracto salino total de Tecuzi 1-74 - (P. acutifolius). C: extracto salino total; E. Pepsina. 60 Mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

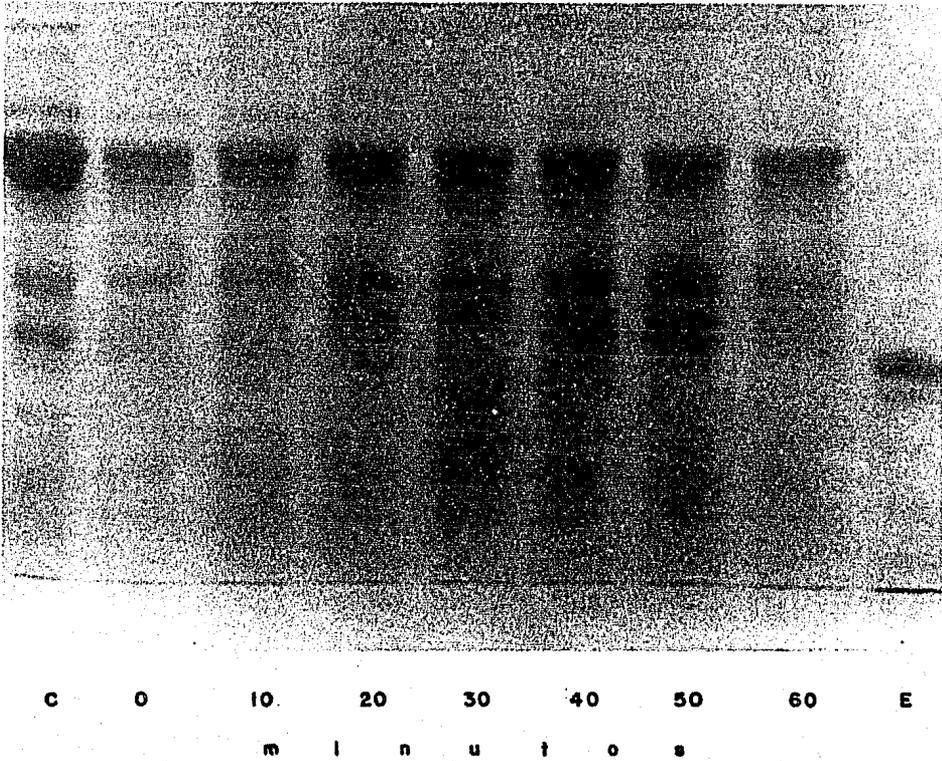


Fig. 39. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de la tripsina, sobre las proteínas desnaturizadas por ebullición durante 120 min, del extracto salino total de Bayo Baranda (P. vulgaris L.). C: extracto salino total; E: Tripsina. 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

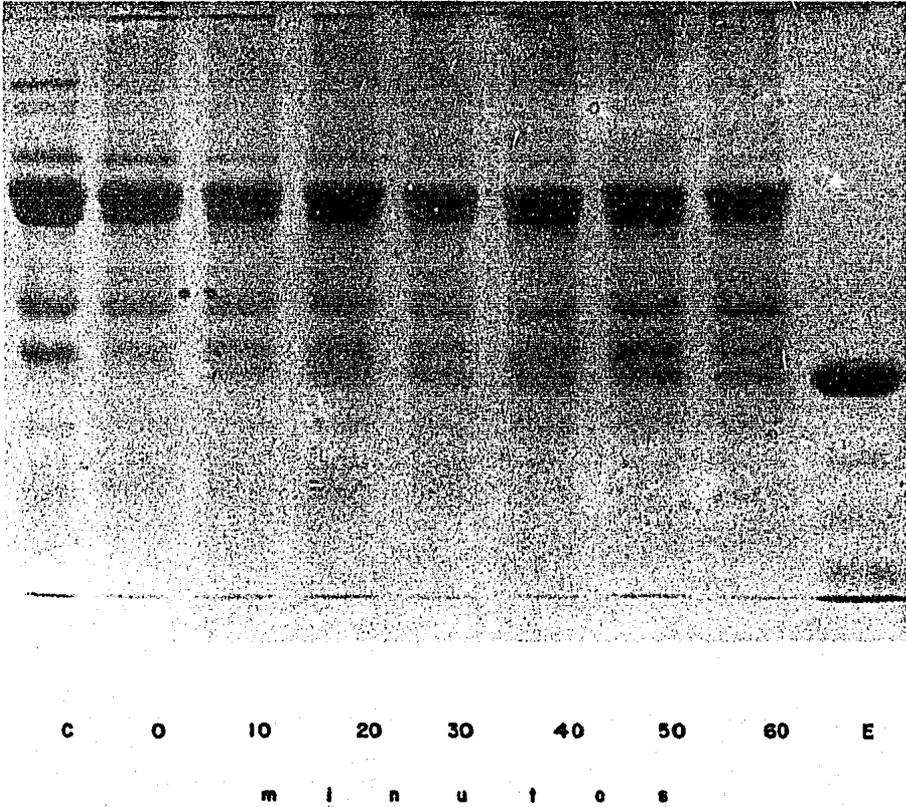


Fig. 40. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de la tripsina, sobre las proteínas desnaturadas por ebullición durante 120 min, en presencia del detergente SDS, del extracto salino total de Bayo Baranda (*P. vulgaris* L.). C: extracto salino total; E: Tripsina. - 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

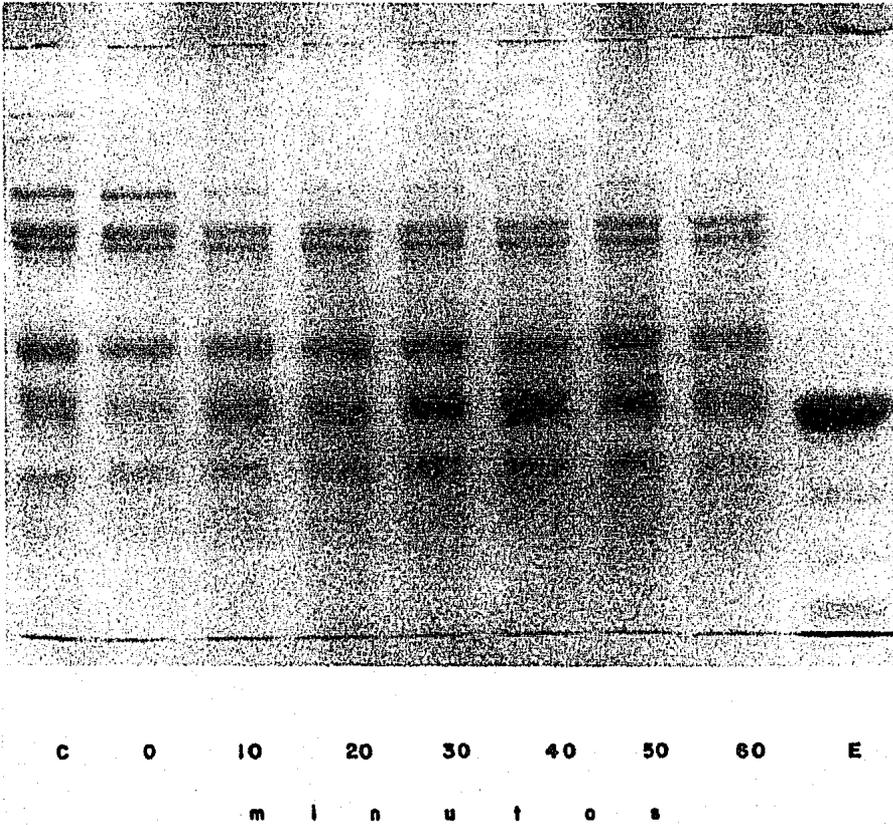


Fig. 41. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de la tripsina, sobre las proteínas desnaturalizadas por ebullición durante 120 min, del extracto salino total de # 209 (P. coccineus), C: extracto salino total; E: Tripsina. 60 Mg proteína por pozo. Tinción con -- azul brillante de Coomassie R-250.

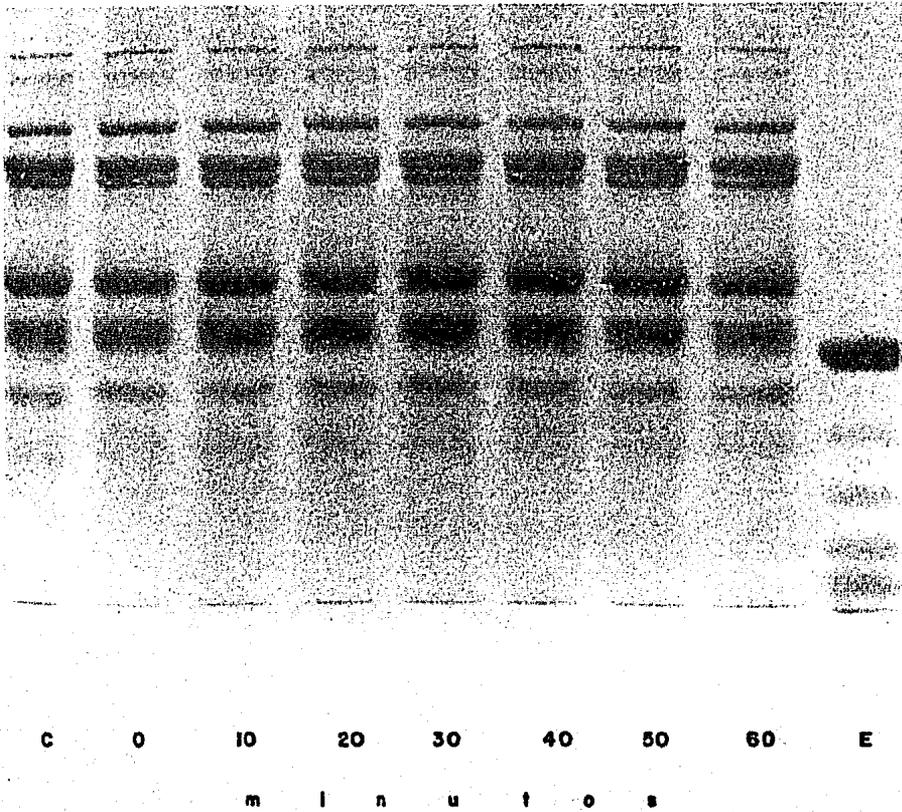


Fig. 42. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de la tripsina, sobre las proteínas desnaturadas por ebullición durante 120 min, en presencia del detergente SDS, del extracto salino total de # 209 (P. -- coccineus). C: extracto salino total; E: Tripsina. 60 Mg - proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

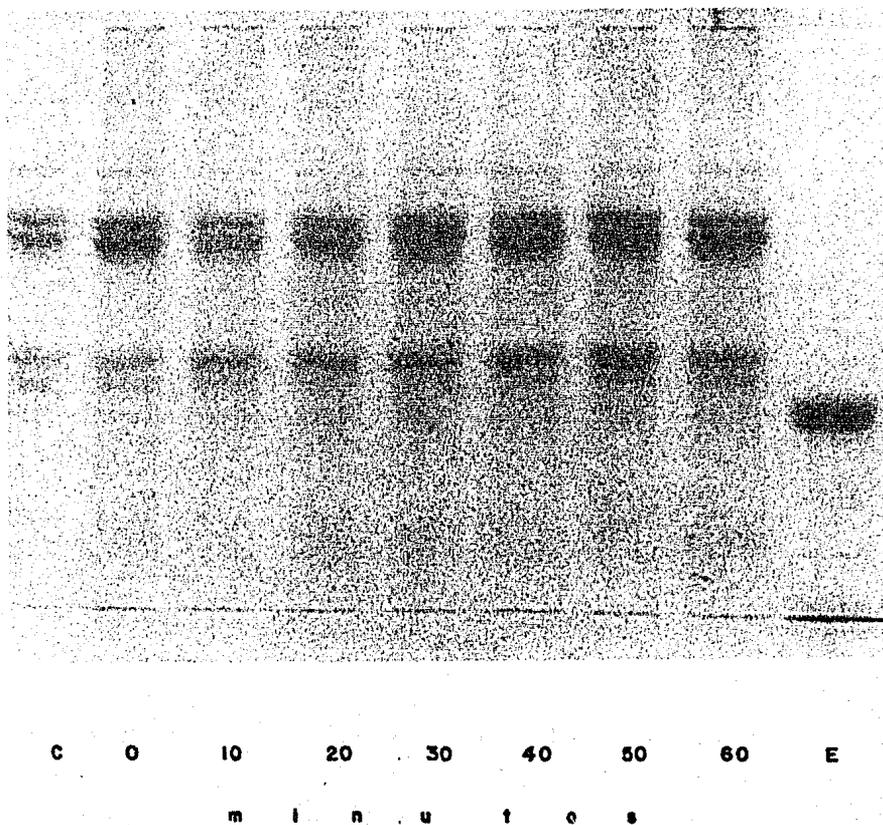


Fig. 43. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de la tripsina, sobre las proteínas desnaturadas por ebullición durante 120 min, del extracto salino total de Tecuzi 1-74 (P. acutifolius), C: extracto salino total; E: Tripsina. 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

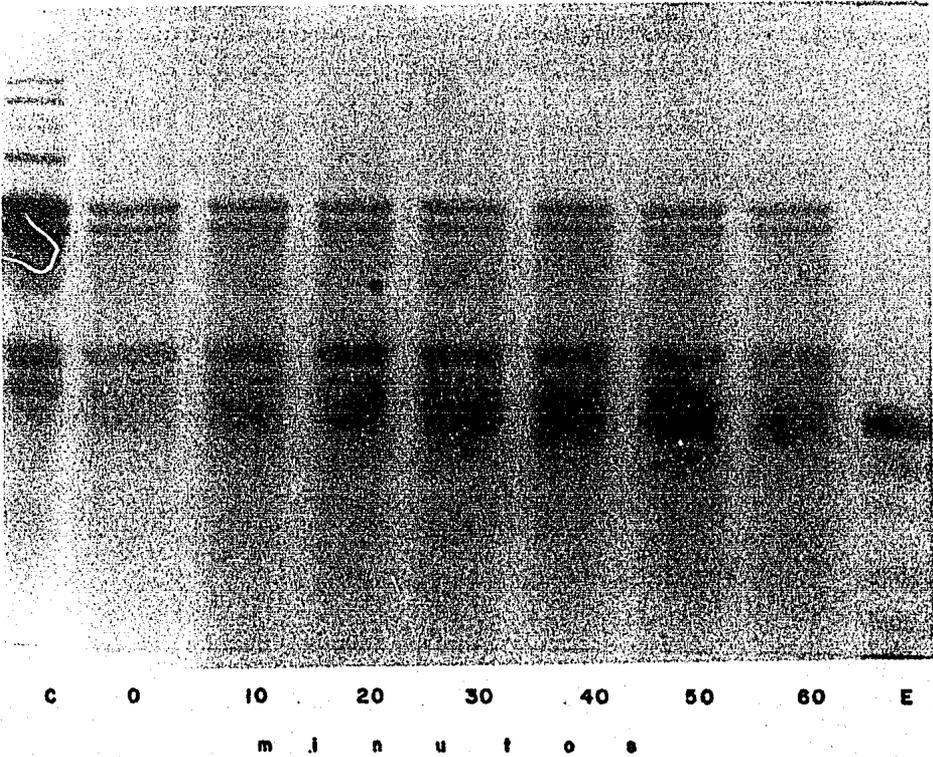


Fig. 44. Análisis electroforético de los productos formados por la acción de la tripsina, sobre las proteínas desnaturalizadas por ebullición durante 120 min, en presencia del detergente SDS, del extracto salino total de Tecuzi 1-74 - (P. acutifolius). C: extracto salino total; E. Tripsina. - 60 mg proteína por pozo. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

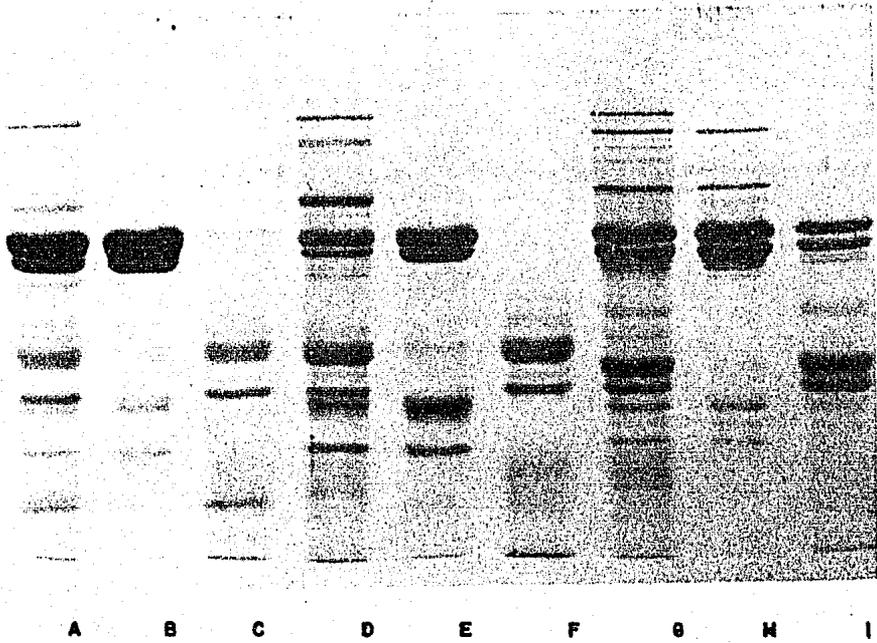


Fig. 45. Separación electroforética de las Extracciones de Globulinas con una variedad de cada una de las especies. A: EST Bayo Baranda (P. vulgaris L.); B: Globulina-1 (G1) Bayo Baranda; C: Globulina 2 (G2) Bayo Baranda; -- D: EST # 209 (P. coccineus); E: Globulina 1 (G1) # 209; - F: Globulina 2 (G2) # 209; G: EST Tecuzi 1-74 (P. acuti--folius); H: Globulina 1 (G1) Tecuzi 1-74; I: Globulina 2 (G2) Tecuzi 1-74. 60 Mg proteína por pozo. Tinción con -- azul brillante de Coomassie R-250.

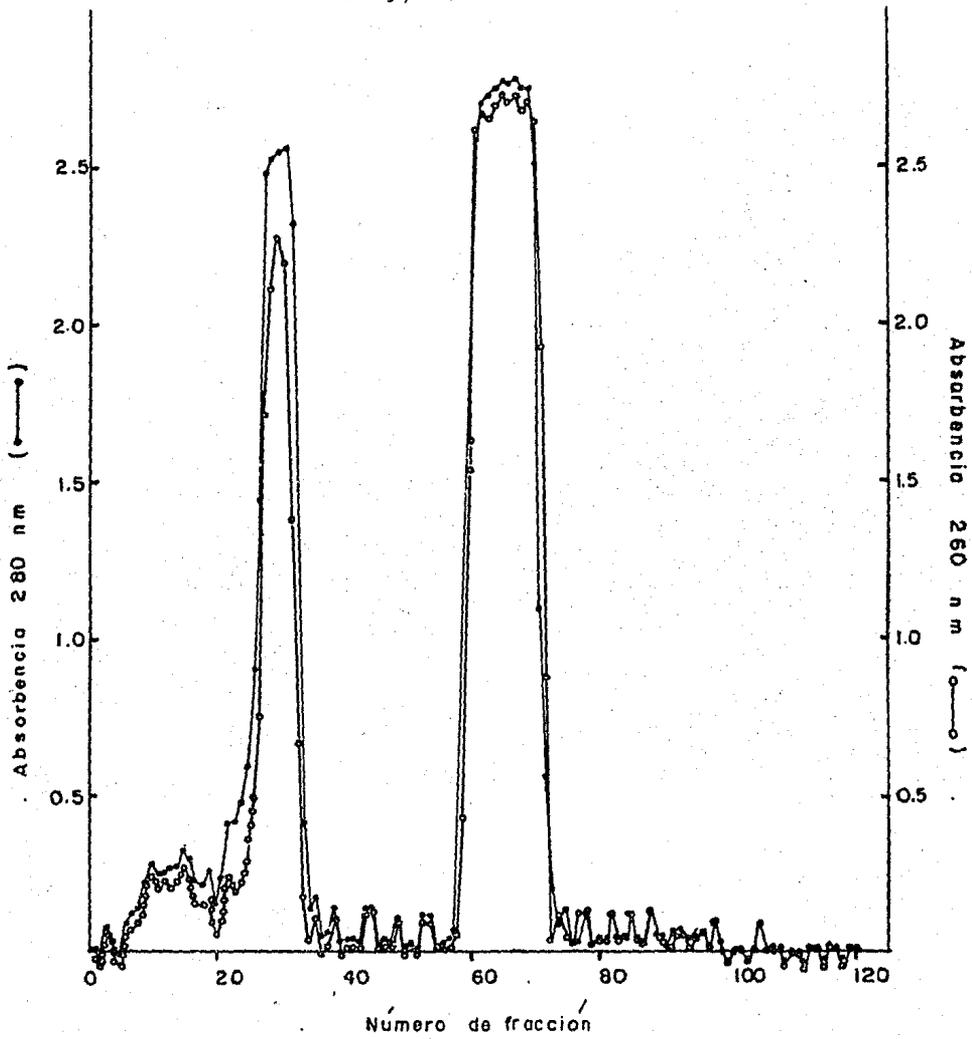


Fig. 46. Patrón de elución de la Globulina G1 de Bayo Berranda (P. vulgaris L.), por filtración en Ultrogel AcA-34.

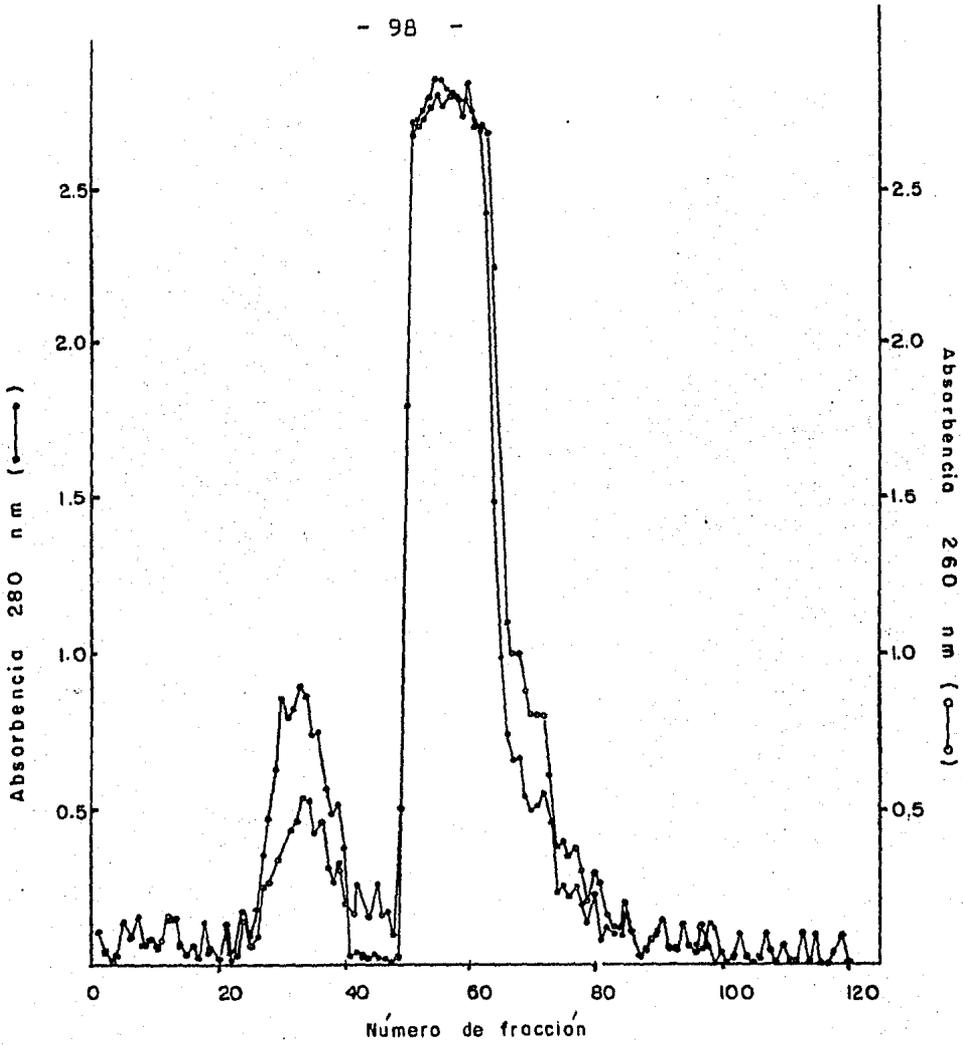


Fig. 47. Patrón de elución de la Globulina G2 de Bayo Barranda (*P. vulgaris* L.), por filtración en Ultrogel AcA-34.

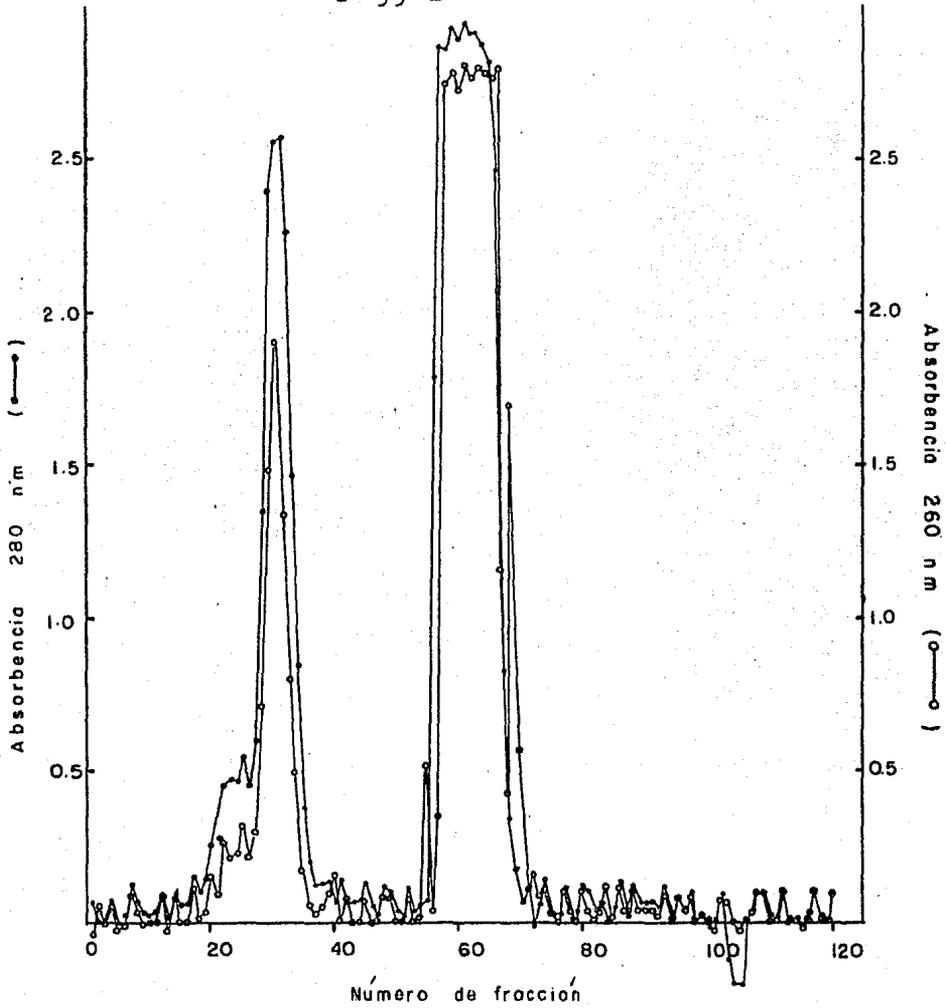


Fig. 48. Patrón de elución de la Globulina G1 de # 209 - (P. coccineus), por filtración en Ultrogel AcA-34.

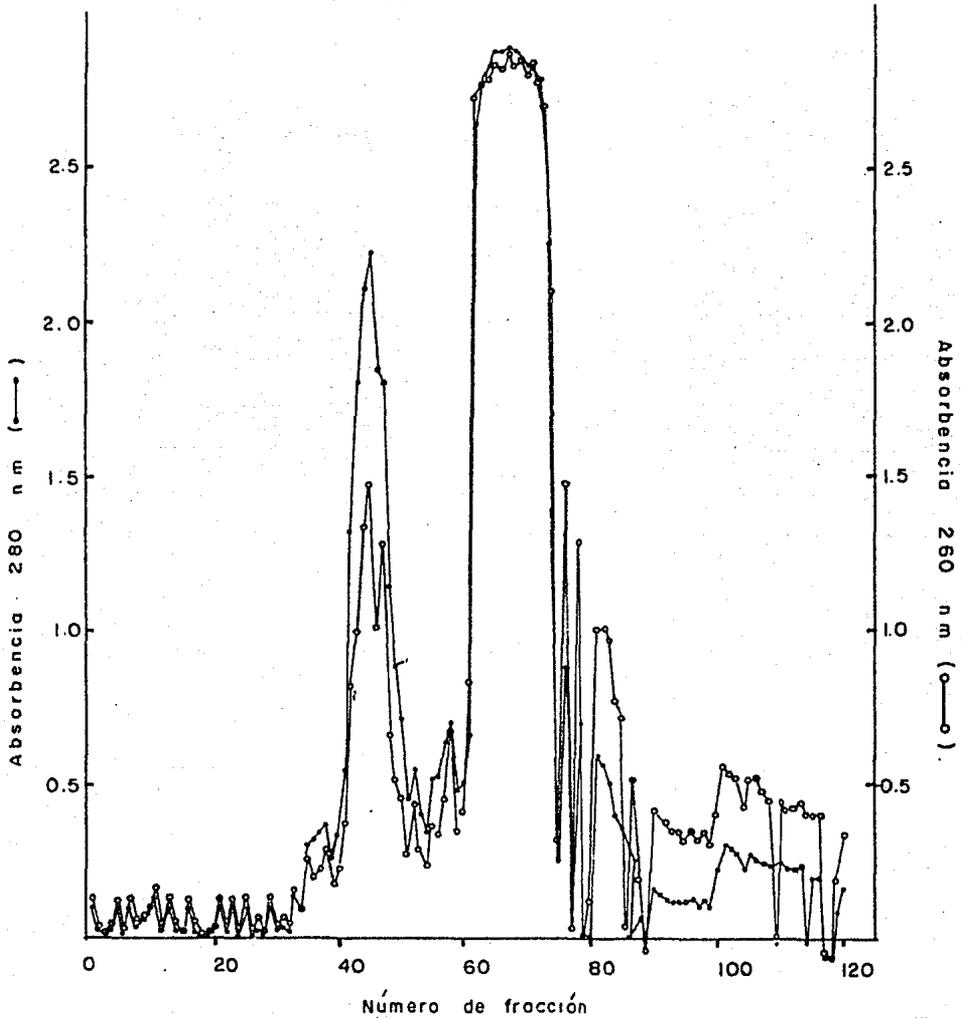


Fig. 49. Patrón de elución de la Globulina G2 de # 209 - (P. coccineus), por filtración en Ultrogel AcA-34.

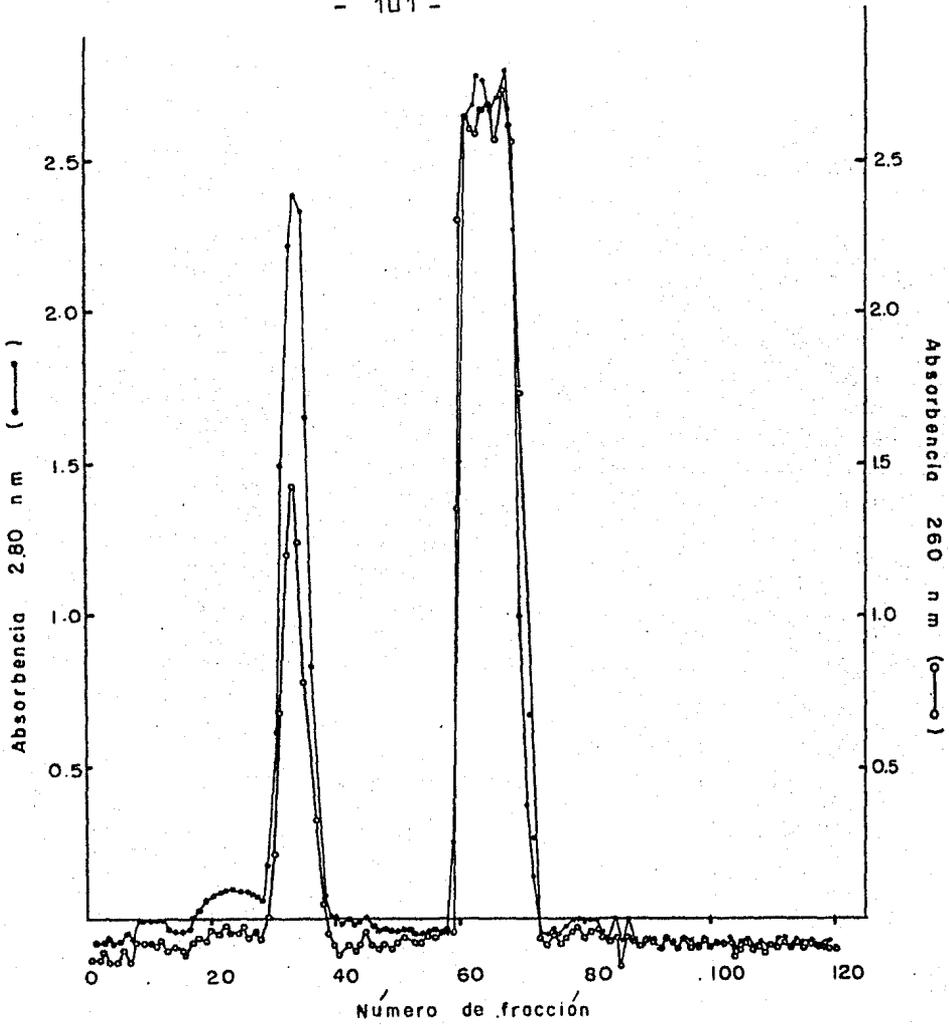


Fig. 50. Patrón de elución de la Globulina G1 de Tecuzi - 1-74 (P. acutifolius), por filtración en Ultragel AcA-34.

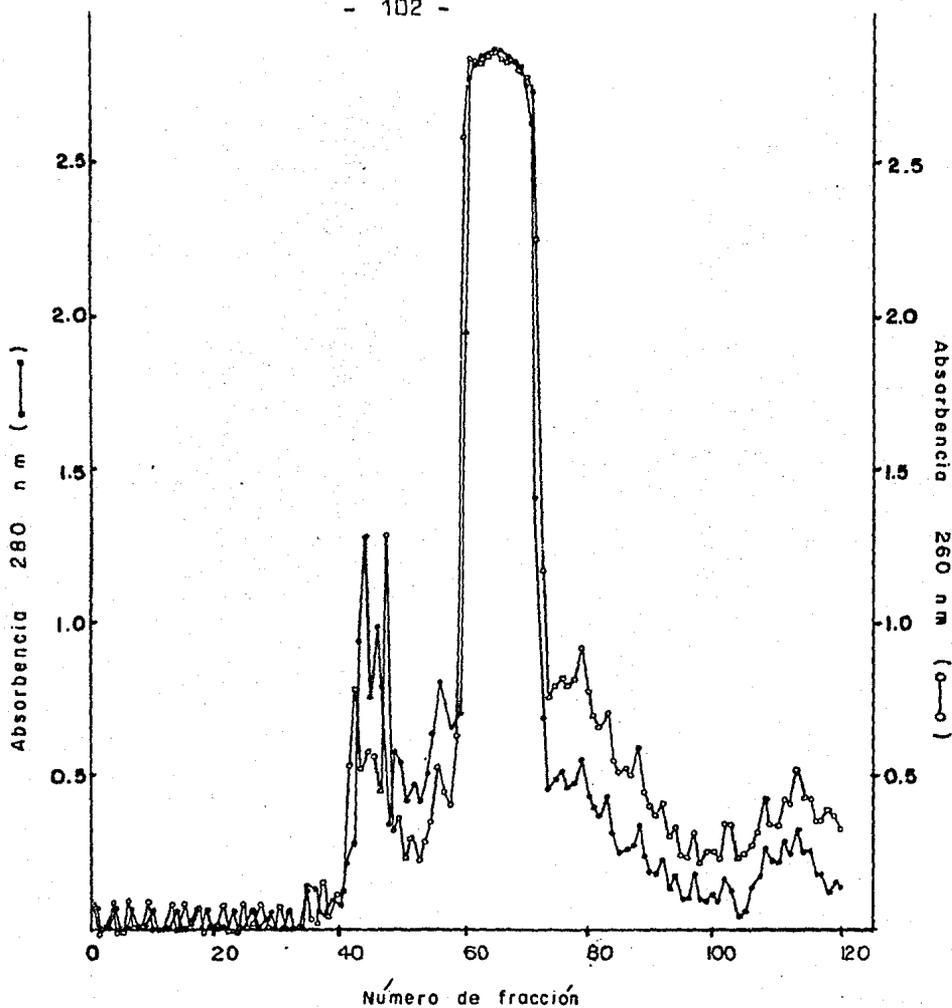


Fig. 51. Patrón de elución de la Globulina G2 de Tecuzi - 1-74 (P. acutifolius), por filtración en Ultrogel AcA-34.

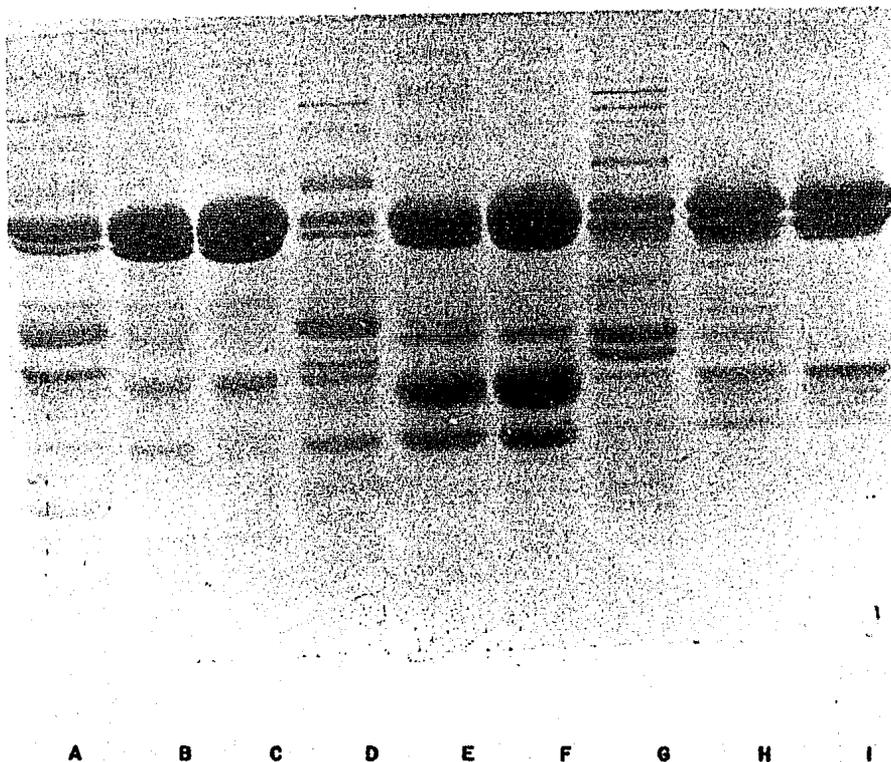


Fig. 52. Análisis electroforético de la globulina G1 purificada por filtración en Ultrogel AcA-34. I.-Bayo Baranda (*P. vulgaris*, L); A: Extracto salino total; B: Extracto de globulina G1; C: Fracción II (Globulina purificada). II.- # 209 (*P. coccineus*); D: Extracto salino total; E: - Extracto de globulina G1; F: Fracción II (Globulina purificada). III: Tecuzi 1-74 (*P. acutifolius*); G: Extracto salino total. H: Extracto globulina G1; I: Fracción II -- (Globulina purificada) 60 µg proteína por pozo.

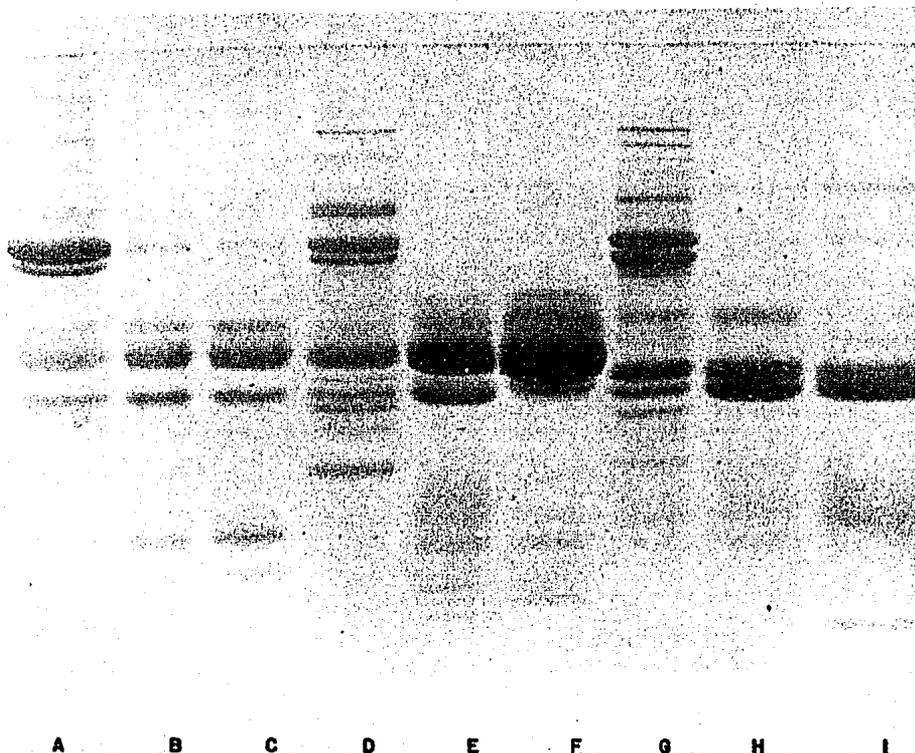


Fig. 53. Análisis electroforético de la globulina G2 purificada por filtración en Ultrogel AcA-34. I.- Bayo Baranda (*P. vulgaris* L.); A: Extracto salino total; B: Extracto de globulina G2; C: Fracción II (Globulina purificada). II.- # 209 (*P. coccineus*); D: Extracto salino total; E: - Extracto de globulina G2; F: Fracción II (Globulina purificada). III.- Tecuzi 1-74 (*P. acutifolius*); G: Extracto salino total; H: Extracto de globulina G2, I: Fracción II (globulina purificada) 60  $\mu$ g proteína por pozo.

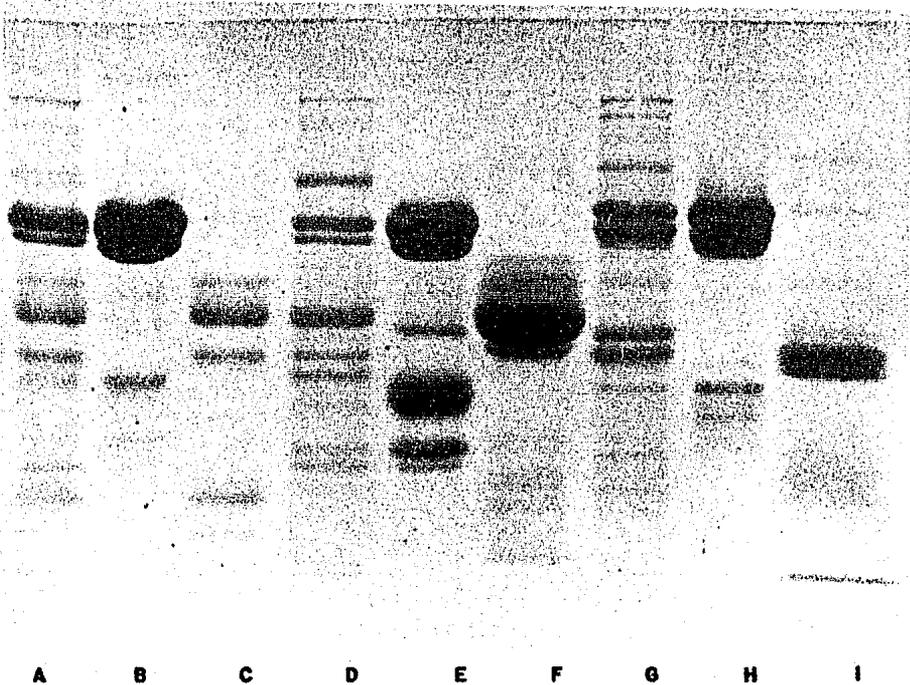


Fig. 54. Análisis electroforético de las globulinas G1 y G2 purificadas por filtración en Ultrogel AcA-34. I.- Bayo Baranda (*P. vulgaris* L.) A: Extracto salino total; B: Globulina G1 purificada (fracción II); C: Globulina G2 purificada (fracción II). II.- # 209 (*P. coccineus*); D: globulina G1 purificada (fracción II); E: Globulina G2 purificada (fracción II). III.- Tecuzi 1-74 (*P. acutifolius*); F: Globulina G1 purificada (fracción II); H: Globulina G2 purificada (fracción III). 60  $\mu$ g proteína por pozo.

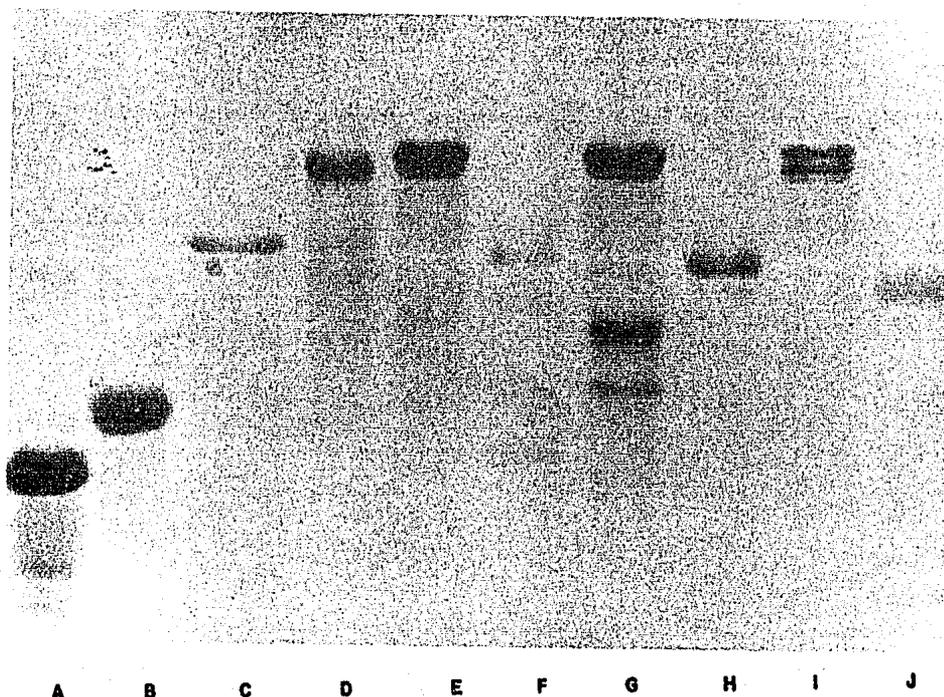
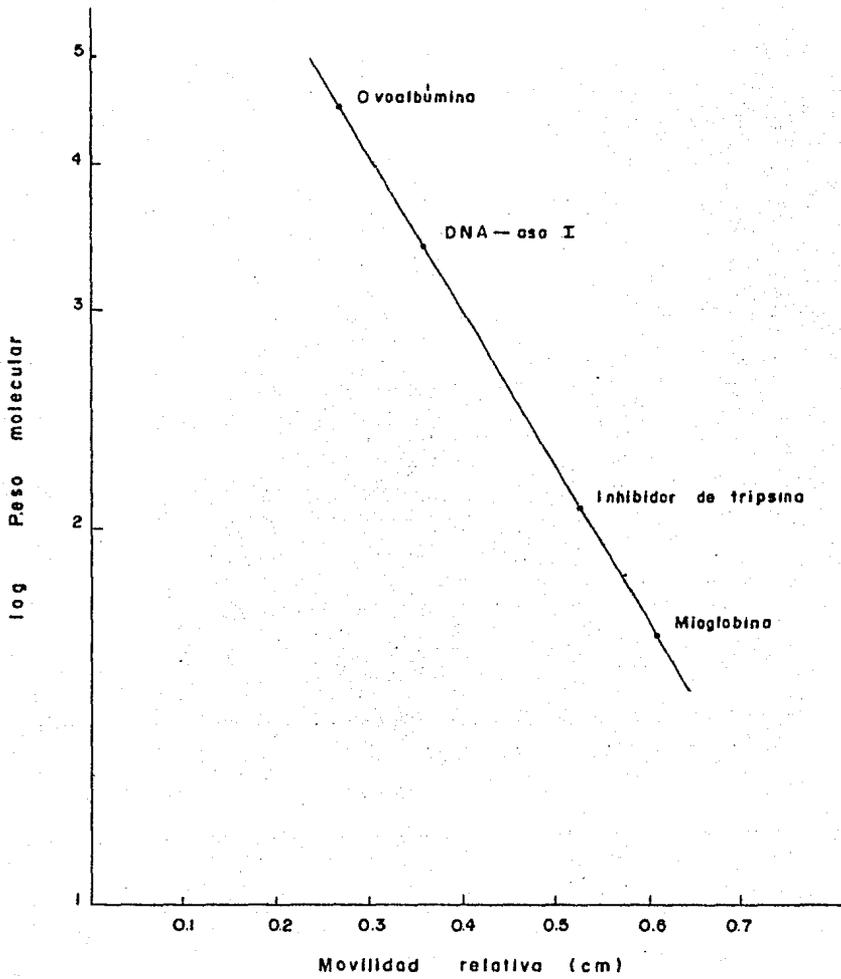


Fig. 55. Movilidad comparativa de las distintas subunidades de las globulinas G1 y G2. A: Mioglobina; B: Inhibidor de tripsina; C: DNA-asa I; D: Albúmina de huevo; E: G1 de Bayo Baranda; F: G2 de Bayo Baranda; G: G1 de # 209; H: G2 de # 209; I: G1 de Tecuzi 1-74; J: G2 de Tecuzi 1-74. 60 g proteína por pozo. Gel de acrilamida al 13%. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.



Gráfica 4. Curva de calibración para la determinación electroforética del peso molecular de las distintas subunidades de las globulinas G1 y G2.

## 6.0 DISCUSION Y CONCLUSIONES.

El análisis electroforético de las proteínas extraídas con solución salina de cada una de las variedades de las especies P. vulgaris L., P. coccineus y P. acutifolius mostró en cada especie el mismo número de bandas e igual movilidad. Al comparar los extractos de una especie con los de las otras especies se encontró gran similitud en cuanto al número y a la movilidad de las principales proteínas de alto peso molecular, existiendo pequeñas diferencias en algunas proteínas de menor peso molecular y de menor importancia por su escasa concentración, las cuales deberán ser estudiadas en posteriores trabajos.

En las proteínas de menor tamaño se observó que los extractos de P. vulgaris L y P. coccineus presentaron dos bandas comunes difiriendo una de ellas a los extractos de P. acutifolius, la cual presentó mayor movilidad lo que indica que ésta es de menor tamaño; también se distinguió en los extractos de la especie P. coccineus una proteína de mayor movilidad y por su intensidad se presume que su concentración es de importancia, el resto de las proteínas o péptidos por su relativa baja concentración no fueron motivo de estudio.

Los extractos salinos totales alternos de las tres especies en estudio, analizados electroforéticamente y teñidos con técnicas específicas para proteínas en general (azul brillante de Coomassie), proteínas con grupos sulfhidrilos (DDD-Fast Black K), y para glucoproteínas (azul alciano), exhibieron el mismo número de bandas y la misma movilidad, observándose menor intensidad cuando se tiñeron para proteínas con grupos sulfhidrilo y para glucoproteínas

en el primer caso puede ser por la escasa cantidad de cisteína, en estudios anteriores se ha informado que las semillas de frijol poseen bajo contenido de aminoácidos azufrados (9,22,23,24). En el caso de las glucoproteínas la disminución en la intensidad, también es debida a su relativa baja abundancia (9,25,26). De las anteriores observaciones se concluye que las proteínas contenidas en los extractos son del tipo de las glucoproteínas, las cuales poseen algunos grupos sulfhidrilos utilizables en unir varias subunidades proteicas, lo cual implica que en su forma nativa - estas proteínas se encuentran formando aglomerados de alto peso molecular (27).

Ante la imposibilidad de realizar el análisis densitométrico de cada uno de los extractos salinos y con el conocimiento de la similitud en el corrimiento electroforético de las proteínas de los distintos extractos de cada una de las especies, se eligió únicamente una variedad de cada especie y se consideró representativa de ésta, las semillas seleccionadas fueron Bayo Baranda (P. vulgaris L) # 209 (P. coccineus) y Tecuzi 1-74 (P. acutifolius). Comparando los esquemas obtenidos se observó que el extracto de Bayo Baranda presentó únicamente 13 picos, el extracto de # 209 presentó 15 picos y el extracto de Tecuzi 1-74 mostró 16 picos. El densitograma de Bayo Baranda (P. vulgaris L) exhibió principalmente cuatro grandes picos, los cuales acumularon 11.29 mg de proteína/ml, que significó un 65.82% del total de proteínas; la variedad # 209 exhibió cinco grandes picos, que contuvieron 7.98 mg de proteína/ml que significó el 55.75% del total; Tecuzi 1-74 presentó cuatro marcados picos con una concentración relativa de 11.52 mg de proteína/ml y un 47.57% del total. Se observó en los esquemas de # 209 la aparición de varias bandas-

de peso molecular pequeño mientras que en Tecuzi 1-74 algunas bandas aparecieron en la región de alto peso molecular.

De los resultados obtenidos electroforéticamente al exponer las proteínas nativas de los extractos representativos de las especies en estudio, a diferentes tiempos de acción de las enzimas pepsina y tripsina, se observó que dichas proteínas no fueron hidrolizadas posiblemente por no tener un estado o conformación tal que les permita a las proteasas hidrolizarlas o también por la posible presencia de un inhibidor específico para estas. Para descartar cualquiera de las posibilidades anteriores o su ocurrencia simultánea, los extractos salinos fueron tratados térmicamente a diferentes tiempos, tratamiento suficiente para desnaturar los inhibidores cuya naturaleza sea del tipo proteico, los cuales con condiciones menos drásticas se modifican y su efecto se anula (25 y 28). También se utilizó este proceso desnaturante para modificar la conformación de las proteínas de los extractos y buscar una mayor susceptibilidad a ser hidrolizadas por las proteasas. De los resultados obtenidos al utilizar como sustrato de las proteasas las proteínas desnaturadas durante 120 min en ebullición, se concluye que a pesar de estar desnaturadas las subunidades de la globulina G1 son las más resistentes a ser hidrolizadas, estos resultados están de acuerdo a los observados por Jaffé y col. (28), quienes proponen que las semillas de frijol negro variedad Cubagua (P. vulgaris L), además de contener un inhibidor de la tripsina, posee un inhibidor de proteasas termoresistente, situación que tiene gran importancia nutricional por ser estas proteínas las más abundantes de la semilla.

Por su relativa mayor abundancia se decidió purificar las globulinas G1 y G2 de las variedades anteriormente seleccionadas como representativas, para posteriormente realizar con estas una serie de estudios que lleven al mejor conocimiento de sus propiedades y del papel fisiológico y nutricional que desempeñan las proteínas de semillas de frijol. El anterior propósito, se intentó alcanzarlo -- primeramente aprovechando las distintas solubilidades ya notificadas (14 y 28), de la globulina G1 y de la globulina G2. Para la extracción de la globulina G1 se utilizó un medio de relativa mayor fuerza iónica formado por NaCl 0.5 M, ácido ascórbico 0.25 M y  $\text{NaN}_3$  0.02% y posteriormente se redujo la fuerza iónica adicionando 5 volúmenes de agua, hecho que ocasionó que la globulina G1 se vuelva insoluble y precipite manteniéndose en disolución la globulina G2. -- El análisis electroforético de las globulinas parcialmente purificadas mostró lo ya comentado cuando se analizaron -- electroforéticamente las proteínas de los extractos salinos totales de las 30 variedades, esto es que la globulina G1 de las tres especies exhibieron semejanzas en su movilidad y en el número de subunidades, por otro lado también se observó que la globulina G2 de Tecuzi 1-74 (P. acutifolius) presentó mayores diferencias en su movilidad electroforética con respecto a Bayo Baranda (P. vulgaris L.) y #209 (P. coccineus) en las cuales la globulina G2 exhibe semejante movilidad.

Posteriormente, procurando una mayor purificación, las distintas globulinas parcialmente purificadas fueron pasadas individualmente por una columna de exclusión molecular empacada con Ultrogel Aca-34 cuyo rango efectivo de fraccionamiento es de 20,000 a 350,000 daltones. Los perfiles de elución de las globulinas G1, de las variedades --

representativas mostraron principalmente dos picos (F II - y F III), los cuales fueron analizados electroforéticamente. La F III no mostró ninguna banda a pesar de que fue -- previamente concentrada y su contenido de proteínas fue -- también muy bajo. Los componentes de esta fracción merecen ser estudiados desde otros puntos de vista por su relativa abundancia.

Comparando los perfiles de elución de las tres variedades estas resultaron ser muy semejantes, hecho que - confirma lo ya observado electroforéticamente, esto es que estas proteínas son de similar tamaño.

La elución de las globulinas G2, de las distintas - variedades mostró también dos grandes picos (F I y F II), - con algunas diferencias en cuanto al número de tubo en que se eluyeron (tamaño molecular) y en su concentración. Estas diferencias en los perfiles de elución de las globulinas G2, sin duda se deben a diferencias en su tamaño molecular, hecho observado electroforéticamente (fig. 53). En las tres variedades analizadas la F II mostró estar en mayor proporción.

Las fracciones de elución de las distintas globulinas fueron comparadas electroforéticamente con sus respectivos extractos crudos y con su extracto salino total. En el caso de la globulina G1 de Tecuzi 1-74 se logró por medio de la columna una notoria purificación al eliminarse - algunas bandas, mientras que con Bayo Baranda y # 209 el - paso por la columna no arrojó una notoria purificación. Para la globulina G2, Tecuzi 1-74 también mostró una mayor - purificación al ser pasado por la columna, en las otras -- dos variedades no se observó una notable purificación. De-

Estos resultados se desprende que la purificación de las globulinas G1 y G2 de estas semillas por sus diferentes solubulidades es un buen método tomando en cuenta su capacidad de volúmen de trabajo, equipo empleado y costo.

De las globulinas G1 y G2 purificadas se compararon sus movilidades electroforéticas con proteínas de peso molecular conocido y exhibiendo para la globulina G1 de las tres variedades un peso molecular alrededor de 150,000 daltones y para la globulina G2 alrededor de 61,000 daltones- para Bayo Baranda (*P. vulgaris* L.) y # 209 (*P. coccineus*)- y de 58,000 daltones para la variedad Tecuzi 1-74 (*P. acutifolius*).

7.0 BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Crispín, MA. y Miranda, C.S. 1968. El frijol; un cultivo importante en México. INIA, SAG, Folleto de Divulgación No. 37.
- 2.- Kaplan, L. 1965. Archeology and domestication of American Phaseolus. Economic Botany. 23: 358-368.
- 3.- Resúmenes de Investigación. Frijol 1980, CIANOC=INIA SARH, Núm. 1, México 1982.
- 4.- Altschul, A.M., Yatsu, L.Y., Dry, R.L., Engleman, E. M. 1966. Plant. Physiol. 17: 113-136.
- 5.- Romero J., Sun S.M., McLeester, R.C., Bliss, F.A. -- and Hall, T.C. Heritable variation in polypeptide subunit of the mayor storage protein of the bean, -- Phaseolus vulgaris L. Plant. Physiol 56. 776-779. - 1975.
- 6.- Millerd, A. 1975. Biochemistry of Legume seed Proteins. Ann. Rev. Plant. Physiol. 26: 53-72.
- 7.- Osborne, T.B., Campbell, G.F. 1896. J. Am. Chem. Soc. 18: 583-609.
- 8.- Danielsson, C.E. 1950. Acta. Chem. Scand. 4: 762- - 771.
- 9.- Ericson, M.C., Chrispeels, M.J. 1973. Plant. Physiol. 52: 98-104.
- 10.- Pusztai, A. and Watt, W.B. 1970. Glycoprotein II: The Isolation and characterization of a major antigenic -

and nonhaemagglutinating glycoprotein from Phaseolus vulgaris. Biochem. Biophys. Acta 207: 413-431.

- 11.- Hill, J.E. and Breindenbach, R.W. 1974. Plant Physiol 53: 742-746,
- 12.- Blagrove, R.J. and Gillespie, J.M. 1975. Aust. J. - Plant Physiol. 2. In Press.
- 13.- Sun, S.M., Mutschler, M.A., Bliss, F.A. and Hall, -- T.C. 1978. Protein Synthesis and acumulation in bean cotyledons during growth. Plant Physiol. 61: 918-923.
- 14.- Sun, S.M. and Hall T.C. 1975. Solybility characteristics of Globulin from Phaseolus seed in Regard to - their Isolation and characterization. J. Agr. Food.- Chem. Vol. 23 No. 2: 184-189.
- 15.- Oyama, V.I. and Eagle, H. 1956. Measumerent of Cell-Growth in Tissue culture with a Phenol Reagent (Fo-- lin-Ciocalteu), Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91: 305-307.
- 16.- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins- during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, Vol. 227 No. 15. 680-685.
- 17.- Wardi, A. and Michos, G. 1972. Alician Blue Staining of Glycorpoteins in acrilamide disc electrophoresis. Anal. Biochem. 49: 607-609.
- 18.- Telser, A. and Rovin, B. 1980. A specific stain for sulfhydryl groups in proteins after separation by - polyacrylamide Gel electrophoresis. Blochimica et - Biophysica. Acta 624: 363-371.

- 19.- Weber K. and Osborn, M. 1969. The Reability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. The Journal of Biological Chemistry. 244 (16): 4106-4112.
- 20.- Rick, W. and Fritsch, W.P. 1974. Methods of Enzymatic Analysis (Bermeyer H.V. ed), 2a. ed. Vol. 2, pp. 1046-1052.
- 21.- Rick, W. 1974. Methods of Enzymatic Analysis. (Bermeyer, H.V. ed) 2a. ed. Vol. 2, pp. 1013-1015.
- 22.- Ortega, D., M.L. Rodríguez, C.C. y Hernández X. 1974. Análisis Bioquímico de los genotipos de Phaseolus vulgaris, L. y p. coccineus cultivados en México. Fiototecnia Latinoamericana. 10: 70-74.
- 23.- Mutscher, M.A., Bliss, F.A., and Hall, T.C. 1980. -- Variation in the Accumulation of Seed Storage Protein Among Genotypes of Phaseolus vulgaris L.). Plant Physiol. 65: 627-630.
- 24.- Kanamori, M., Ikeuchi, T. Ibuki, F., Kutaro, M., and Kung Kan, K. 1982. Amino Acid Composition of Proteina Fractions Extracted from Phaseolus Beans and the -- Field bean (Vicia faba L.). Journal of Food Science-Vol.47, 1991-1994.
- 25.- Pusztai, A. 1966. The Isolation of two Proteina, Glycoprotein I and a trypsin Inhibitor, from the Seeds of Kidney Bean (Phaseolus vulgaris). Biochem. J. -- 101: 379-384,
- 26.- Ortega D.M.L. 1979. Bioquímica. Contribuciones al cg

nocimiento del frijol (Phaseolus) en México. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 101-112.

- 27.- Sun, S.M. McLeester, R.C., Bliss. F.A., and Hall, T.C. 1974. Reversible and Irreversible Dissociation of - Globulins from Phaseolus vulgaris Seed. Journal of - Biological Chemistry. 249: 2118-2121.
- 28.- Seidl, D., Jaffé, M. and Jaffé M.G. 1969. Digestibi- lity and Proteinase Inhibitory Action of a Kidney -- Bean Globulin. Journal, Agr. Food. Chem. 17 (6): - 1318-1321.

FE DE ERRATAS

EN LA PAGINA 24

DICE:                   GRAFICA No. '9

DEBE DECIR:           GRAFICA No. 1

EN LA PAGINA 53

DICE:                   DISTINGOS

DEBE DECIR:           DISTINTOS