



5
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO 2EJ

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENES TRIMESTRALES
FAC. DE QUIMICA

OBTENCION DE UN EXTRACTO ENZIMATICO CON
ACTIVIDAD DE BETA - GLUCOSIDASA A PARTIR
DE SEMILLAS DE CAPULIN (PRUNUS SEROTINA).

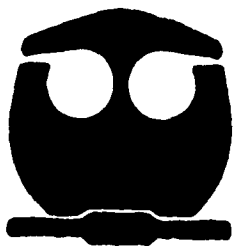
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

FABIOLA CONSUELO AYHLLON MEIXUEIRO



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

Presidente
Vocal
Secretario
1er Suplente
2do Suplente

Prof. Angela Sotelo López
Prof. Pedro Valle Vega
Prof. Bernardo Lucas Florentino
Prof. Miguel Hernández Infante
Prof. Lucía Cornejo Barrera

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, División de Estudios de
Posgrado, Facultad de Química, UNAM**

Asesor del tema


M. en C. Bernardo Lucas Florentino

Sustentante


Fabiola C. Ayhlón Meixueiro

Antes que nada: Gracias Dios

Quisiera dedicar este trabajo, con el agradecimiento profundo que ello conlleva a:

La UNAM, por lo mucho (todo) que nos brinda.

La Facultad de química.

A los profesores que he tenido a lo largo, no solo de mis estudios, sino de la vida misma, de quienes siempre he aprendido, y no se termina de aprender.

A mi asesor, Bernardo Lucas F. Por su gran accesibilidad, todos sus conocimientos y el apoyo que no olvidaré.

A la maestra Ángela Sotelo L. Por haberme recibido en su laboratorio.

Y por supuesto no sería nadie, o por lo menos alguien tan feliz, si no tuviera conmigo a todos ustedes (familiares y amigos), que me han apoyado tan diversa e incondicionalmente.

A mis padres : Antonio Ayhlón Bucio y H. Elizabeth Meixueiro S.

A mis hermanos : Toño y Liz

Papito: Porque sin tu gran capacidad, no solo de audacia e inteligencia, sino también de amor, yo no habría logrado todo lo que he anhelado. Y quiero decirte aquí, y aún através del tiempo, que podría desbordarme en admiración, amor y agradecimiento por ti, pero el sentimiento es infinito e inefable.

Mami : Por tu gran bondad y esa honestidad que trato de imitar, porque tienes un espíritu de lucha inigualable, por tu sonrisa eterna y tu buen humor, por mil cosas mas, te adoro mamita.

Toño : Porque jamás pude haber tenido mejor hermano que tú, porque no solamente has sido eso, sino un ejemplo en muchos aspectos, por todo tu amor y el apoyo que siempre me das. Vaya pues una dedicatoria especial para ti.

Liz : Porque admiro tu nobleza, y me siento orgullosa de ti, porque si algo me has enseñado, es la fuerza para lograr lo deseado.

Jaime : Por tu siempre buena persona y disposición.

A quien tengo y tendré siempre conmigo, aunque no físicamente:
Papá Tino, Mamá Feguita, Papá Benjamín y Pedrito.

A mis amigos del laboratorio: Elisita, Hugo, Lalo, Lorna, Lety, Manolo, Chela y Aarón. Por los bellos momentos que nunca quiero olvidar. A Sergio, por él y su invaluable compañía(incluso los sábados en el laboratorio).

No cambiaría los increíbles momentos, ni todo el cariño y la confianza de :
Ili, Ice, Lore, Vero, Tere N., Alejandro G.,
Pepe, Yaz, Enrique, Gaby R., Noé, Gaby G., Juan
C., Gaby C., Gabriel, Lupita, Águeda, Alicia,
Jorge, Sergio y quienes escapan en este momento
de mi memoria. A ti Claus J: Por tu amistad por
supuesto, y por el apoyo, que jamás olvidaré,
para lograr el gran paso que voy a dar. A ti
Alberto L., por los bellos momentos.

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	2
<u>CAPITULO I</u>	3
GENERALIDADES	3
Historia	3
Origen biosintético y estructura	6
Catabolismo	8
Distribución	13
Factores que afectan el contenido de glucósidos cianogénicos, prevención del envenenamiento	15
Importancia de los glucósidos cianogénicos	20
La enzima β -Glucosidasa	21
Importancia de la β -Glucosidasa	22
Breve revisión de tecnología enzimática, purificación de enzimas	25
Fuente	25
Ruptura celular y extracción	26
Recolección	27
Criterio de avance	29
Criterio de pureza	31
<u>CAPITULO II</u>	32
PARTE EXPERIMENTAL	32
MATERIAL Y METODOS	32
Material vegetal utilizado	32
Tratamiento de la muestra	32
Método general de trabajo	33
Desarrollo	33
METODOS	38
Método para la determinación de glucósidos cianogénicos	38
Método para la determinación de glucosa	43
Curva de actividad de la β -Glucosidasa comercial	45
Actividad de la β -Glucosidasa endógena	47
Determinación de proteína	49
OBTENCION DE UN EXTRACTO SEMIPURIFICADO CON ACTIVIDAD DE β-GLUCOSIDASA	52
Purificación	53
Diagrama de flujo pila obtención	58
Comparación preliminar de la enzima comercial con el liofilizado obtenido, que la contiene	59

<u>CAPITULO III</u>	60
RESULTADOS Y DISCUSION	60
Porcentajes	61
Contenido potencial de β -Glucosidasa	63
Inactivación de la enzima endógena	65
Curva de actividad de la β -Glucosidasa comercial	68
Determinación de proteína	72
Actividades	75
Obtención de un extracto semipurificado con actividad de β -Glucosidasa	77
Comparación de la enzima comercial con el liofilizado obtenido, que la contiene	79
CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFIA	83

INTRODUCCIÓN

Los glucósidos cianogénicos, son compuestos tóxicos cuando son hidrolizados por la enzima β -Glucosidasa porque liberan entre sus productos ácido cianhídrico, que es un compuesto sumamente venenoso, ya que actúa a nivel de citocromo oxidasa.

Los glucósidos cianogénicos, se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y aunque la intoxicación a causa de estos compuestos es de mayor frecuencia en la alimentación animal, también existen problemas serios en la alimentación humana; por ello es importante poder cuantificar el contenido de glucósidos cianogénicos en los alimentos.

En los métodos desarrollados para la cuantificación de los glucósidos cianogénicos, es necesario la adición de una fuente de β -Glucosidasa externa. Por tanto, cobra relevancia obtener un preparado que tenga una adecuada actividad enzimática y que pueda sustituir a la enzima comercial; que es de importación y además muy costosa.

Además esta enzima, es utilizada en aplicaciones industriales, como lo es la obtención de glucosa a partir de celulosa o en el procesamiento de productos alimenticios, como son jugos de frutas y vinos.

Precisamente, el objetivo de esta tesis fue el de obtener un extracto con actividad de β -Glucosidasa, a partir de almendras de semillas de capulín, para lo cual se caracterizó bromatológicamente la muestra y se desengrasó para proseguir con el proceso de purificación (preparación del homogeneizado, filtración, centrifugaciones, diálisis) del cual se obtuvo el extracto con actividad de β -Glucosidasa, que se estabilizó por medio de una liofilización, obteniéndose un muy buen rendimiento y una actividad aumentada en poco mas del doble con respecto a la harina desengrasada de la que se partió. El seguimiento en el avance de la purificación fue monitoreado determinando la concentración de proteína y la actividad enzimática, ésta última, por medio de la cuantificación de glucosa (producto de hidrólisis de los glucósidos cianogénicos).

OBJETIVO

Obtención de un extracto enzimático estable, prepurificado, a partir de la almendra de la semilla de capulín (*Prunus serotina*), que tenga adecuada actividad de β -Glucosidasa; con aplicación a futuro para poder sustituir a la enzima de importación en la determinación espectrofotométrica de glucósidos cianogénicos.

CAPITULO I

GENERALIDADES

HISTORIA

La cianogénesis, es decir la producción de ácido cianhídrico, por organismos biológicos, ha merecido atención y estudio por parte de los científicos durante mas de un siglo, ello se debe principalmente a que el ácido cianhídrico cuya fórmula química es HCN , es un compuesto altamente tóxico, 200 mg. pueden ser una dosis letal para un humano adulto de aproximadamente 58 Kg. de peso, ya que la dosis mínima letal del HCN , vía oral, ha sido estimada entre 0.5 y 3.5 mg. / Kg. de peso corporal (1, 2, 3). La tabla I reporta algunos de los mas altos niveles de liberación de ácido cianhídrico en varias plantas principalmente de consumo humano. En adición a estas plantas varias hojas particularmente de las especies Sorbus y Prunus pueden también causar envenenamiento a los animales, como por ejemplo la linaza que es un alimento importante para el ganado vacuno.(3).

El ácido cianhídrico es un efectivo inhibidor de muchas metaloenzimas pero la citocromo oxidasa, oxidasa terminal de los organismos aerobios, es su sitio primario de acción, así pues el envenenamiento por ácido cianhídrico resulta en una muerte por falta de oxígeno a nivel celular, y el cerebro es probablemente el órgano mas susceptible (2)

Cientos de especies de plantas, incluyendo muchas económicamente importantes por ser de consumo principalmente animal (forrajes) pero también

TABLA 1

Algunos de los valores mas altos de liberación de HCN en diferentes plantas (ref. 4)

Planta	Contenido potencial de HCN mg/100g muestra
Almendras amargas	250
Cassava amarga	
Raiz seca	245
Raiz entera	53
Corteza de la raíz fresca	89
Corteza del tallo fresco	133
Hojas	104
Sorgo	
Planta entera inmadura	250
Bambú	
Algunos brotes inmaduros	800
Tallo inmaduro	300
Variedades de Frijol de Lima (<i>Phaseolus lunatus</i>)	
Colorido , Java	312
Negro, Puerto Rico	300
Blanco, Burma	210
Coloreado , Arizona	17
Blanco, Americano	10

de consumo humano, acumulan compuestos generadores del venenoso HCN entre estos compuestos se encuentran los llamados Glucósidos cianogénicos. (4), que desde su primer descubrimiento en vegetales, por Liebig y Wohler en 1837, en la actualidad se conocen más de 2,500 plantas que los contienen (1). En vista de que la liberación del HCN ocurre solamente cuando se daña el tejido celular, se ha sugerido que la función de estos compuestos es la de proteger a las plantas del ataque de sus depredadores (por los catabolitos que generan); y de acuerdo a estudios mas recientes, parece que tienen una función muy importante en la biosíntesis de ciertos aminoácidos (4).

Aunque la intoxicación por compuestos cianogénicos es de mayor frecuencia en la alimentación animal; no se descarta la presencia de estos compuestos en algunos alimentos para consumo humano en donde pueden encontrarse en altas concentraciones; así tenemos: "amigdalina" en almendras amargas, "durrina" en el sorgo y "linamarina" en la cassava y el frijol de lima (3).

La Amigdalina fue el primer glucósido cianogénico del que se tuvo conocimiento, fue aislado en 1830 de las semillas de almendra amarga (*Prunus amigdalus*), y es el mas conocido y estudiado hasta el momento (5). Este tipo de compuestos *per se*, es decir, en su forma íntegra no causarían problemas de intoxicación, sin embargo al ser hidrolizados es cuando presentan el peligro. La enzima responsable de su hidrólisis es una β -Glucosidasa (Su nombre sistemático es β -D-glucósido glucohidrolasa y su número según la clasificación del comité de enzimas (E.C.) es 3.2.1.21), la cual en un principio se denominó "emulsina".

No obstante que el material biológico que contiene esta clase de glucósidos, tiene a su vez, el sistema enzimático, estos se encuentran en diferente compartimento celular, y sólo al presentarse un daño físico se pueden poner en contacto sustrato y enzima y liberar el HCN (6).

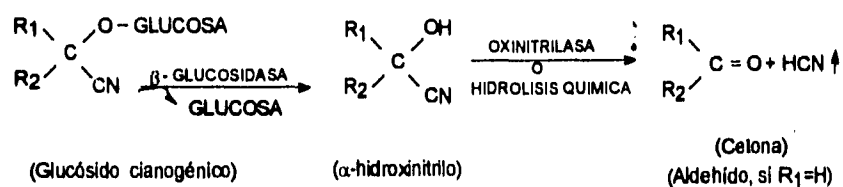


FIG. 1 HIDRÓLISIS DE UN GLUCÓSIDO CIANOGENICO

ORIGEN BIOSINTÉTICO Y ESTRUCTURA.

La biosíntesis de los glucósidos cianogénicos ha sido extensamente estudiada. Estos compuestos derivan de aminoácidos como L-fenilalanina, L-tirosina, L-valina, L-isoleucina y L-leucina o del aminoácido no proteico ciclopentenil glicina. Investigaciones en varios laboratorios han encontrado los precursores de 4 de los glucósidos cianogénicos conocidos; precisamente estos aminoácidos precursores se mencionan a continuación: L-tirosina, precursor de la durrina; L-fenilalanina, precursor de la prunasina; L-valina, precursor de la linamarina; y L-isoleucina, precursor de la lotaustralina.

No se conoce con certeza, la ruta de biosíntesis de los glucósidos cianogénicos a partir de los aminoácidos, pero se han estudiado y propuesto algunas posibles rutas de biosíntesis, que se muestran en la figura 2.

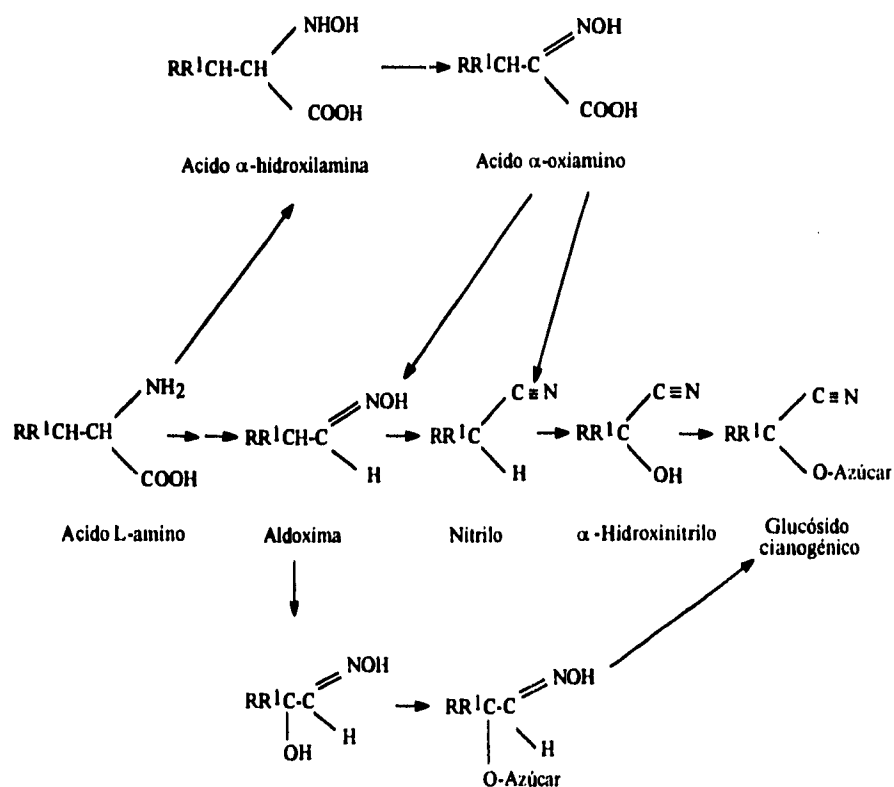


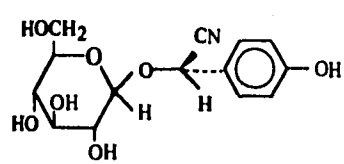
Figura 2. Diversas rutas de biosíntesis de glucósidos cianogénicos

Debido a la naturaleza de sus aminoácidos precursores, la porción de aglucón del glucósido cianogénico puede ser de naturaleza aroinática, alifática o cíclica también pueden existir variaciones en la naturaleza del carbohidrato presente; de los 32 glucósidos cianogénicos reportados, 24 son monosacáridos, teniendo a la D-Glucosa como azúcar estable. (Fig. 3). Los demás entre los cuales esta la (R)-amigdalina, (R)-vicianina, (R)-lucumina, linustatina y neolinustatina son cianogénicos disacáridos en los que la cianohidrina se estabiliza por medio de la β -gentiobiosa, vicianosa o primaverosa (Fig.4) (1).

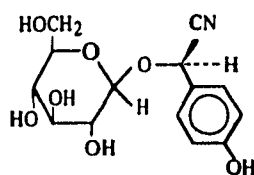
CATABOLISMO.

Con la pérdida de la integridad de la planta, los glucósidos cianogénicos son rápidamente catabolizados por la enzima β -Glucosidasa (o complejo enzimático). La hidrólisis del glucósido cianogénico libera un α -Hidroxinitrilo que es degradado subsecuentemente por una α -Hidroxinitriliasa o espontáneamente, hasta el correspondiente aldehído o cetona, mas la liberación del HCN.

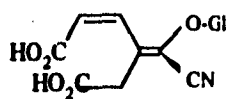
En lo que a los cianogénicos disacáridos se refiere, la forma en que éstos son hidrolizados permanece aún no muy clara. Teóricamente, 2 diferentes rutas de degradación pueden existir (Fig. 5).



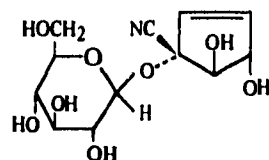
(S)-DURRINA



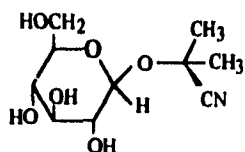
(R)-TAXIFILINA



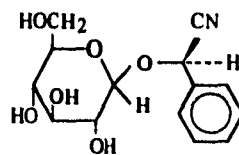
TRIGLOQUININA



GINOCARDINA

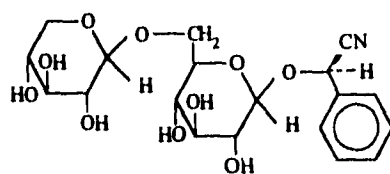


LINAMARINA

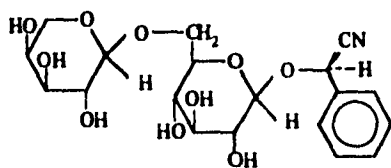


(R)-PRUNASINA

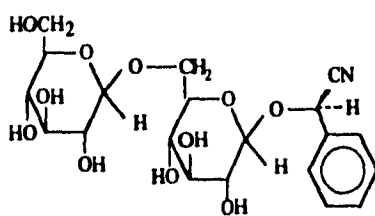
FIGURA 3 Estructuras de algunos de los glucósidos cianogénicos monosacáridos conocidos



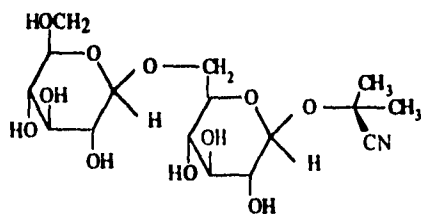
(R)-LUCUMINA



(R)-VICIANINA



(R)-AMIGDALINA



LINUSTATINA

FIGURA 4 Estructuras de algunos de los glucósidos cianogénicos disacáridos conocidos

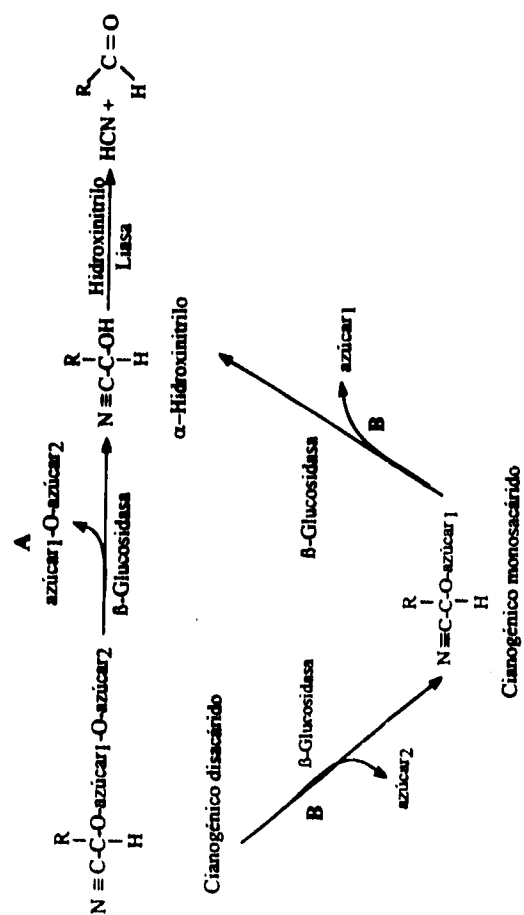


Figura 5 Posibles rutas de hidrólisis de los glucósidos cianogénicos disacáridos

La tabla 2 muestra los glucósidos cianogénicos mas conocidos en cuanto a su estructura, así como las especies en las que se encuentran con mayor frecuencia.

TABLA 2
Presencia y estructura de algunos glucósidos cianogénicos (ref.2)

Glucósido	Azúcar en su estructura	Productos de hidrólisis	Planta
Amigdalina	Gentiobiosa	Gentiobiosa + HCN + Benzaldehído	Prunus Sp. miembros de Rosáceas como son: almendra, manzana, cerezo durazno, pera, etc.
Prunasina	D-Glucosa	D-Glucosa + HCN + Benzaldehído	Prunus Sp. miembros de Rosáceas como son: cereza, laurel
Durrina	D-Glucosa	D-Glucosa + HCN + p-hidroxibenzaldehído	Sorgo (<i>Sorghum Sp.</i>)
Linamarina	D-Glucosa	D-Glucosa + HCN + acetona	Frijol de lima (<i>Phaseolus lunatus</i>) muchas variedades, trébol blancó. (<i>Trifolium repens</i>), Cassava (<i>Manihot Sp.</i>) Lino (<i>Linum usitatissimum</i>).
Vicianina	Vicianosa	Vicianosa + HCN + Benzaldehído	Vicia Sp. (almorta común)
Acacipetalina	D-Glucosa	D-Glucosa + HCN + dimetilcetona	Acacia de Sud-Africa (Acacia Sp.)

Ruta A: La hidrólisis en el enlace aglucón-disacárido liberaría un hidroxinitrilo que después liberaría el HCN y el disacárido.

Ruta B: Los dos residuos de azúcar serían removidos individualmente por una hidrólisis secuencial con un glucósido cianogénico monosacárido como intermediario, para llegar al hidroxinitrilo y subsecuentemente al HCN.

Los dos pasos hidrolíticos estarían catalizados por la misma o una distinta β -Glucosidasa. Reportes previos sugieren que ambas rutas de hidrólisis pueden existir en la naturaleza. Lo anterior quedó ilustrado en la figura 5.

DISTRIBUCIÓN.

Los glucósidos cianogénicos se encuentran distribuidos ampliamente en el reino vegetal pero también se han encontrado en insectos y en hongos (2). Así que debe tenerse presente que estos compuestos no son la única fuente de cianuro y que el cianuro puede ser liberado no sólo por plantas sino también por hongos, bacterias e incluso organismos del reino animal.

Dos de los glucósidos cianogénicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal son la linamarina (Fig. 3) y lotaustralina, y un aspecto interesante de estos compuestos es que usualmente coexisten en la misma planta aunque cada uno de ellos puede estar presente en muy diferentes concentraciones, por ejemplo, el lino contiene una mezcla 50:50 de linamarina y lotaustralina mientras que en algunas plantas como en el caso de Lotus arenarius el contenido de estos dos compuestos está en una proporción de 99:1 y en Lotus tenuis, la proporción es de 4:96 (2).

Es difícil generalizar en lo que se refiere a la parte o partes de la planta que contienen a los glucósidos cianogénicos; las hojas frecuentemente contienen la mayor concentración pero los cianogénicos pueden estar en casi cualquier parte de la planta, por ejemplo, las hojas verdes y tiernas del sorgo son una fuente muy rica de cianuro, la concentración de HCN puede alcanzar el 0.2% en estas hojas; por otro lado el sorgo es un material común para su uso como forraje y sus hojas secas y parcialmente en decadencia no causan problemas de toxicidad, esto se debe al rápido rompimiento de los glucósidos cianogénicos y consecuente eliminación del HCN, hecho por las enzimas endógenas conforme la planta se va fermentando en el silo.

Curiosamente la semilla de la planta de sorgo que se utiliza como alimento para los humanos en la India y como alimento para ganado en los Estados Unidos, no es tóxica ya que no contiene cantidades detectables de glucósidos cianogénicos; sin embargo, en la germinación, puede alcanzar una concentración de 3 a 5% de durrina, (en base a peso seco), en un periodo de 3 a 4 días (2).

La amigdalina, vicianina y linustatina son los únicos glucósidos cianogénicos disacáridos de los cuales se ha investigado su ruta hidrolítica (1).

La amigdalina (Fig. 4) (O-B-D-Gentiobiósido de (R)-mandelonitrilo) se acumula en altas concentraciones predominantemente en las semillas de varios miembros de la familia de las Rosáceas (por ejem. almendra amarga, albaricoque, durazno, capulín y cereza) y ha sido responsable de varios casos de envenenamiento por cianuro. También muchas plantas para forraje contienen

gran cantidad de estos compuestos venenosos, en varias etapas de su desarrollo (5).

El mecanismo de hidrólisis de la Amigdalina en la familia de las Rosáceas ha sido estudiado utilizando almendras y albaricoques como fuente de β -Glucosidasa. Algunos datos cinéticos reportan que la "emulsina" (β Glucosidasa) de las almendras contiene dos enzimas involucradas en la hidrólisis de la Amigdalina es decir, que se trata de un complejo enzimático constituido por dos enzimas β -Glucosidasas. La Amigdalín Hidrolasa (AH) que cataboliza, el paso de la Amigdalina a prunasina mas D-Glucosa, y la Prunasín Hidrolasa (PH) que hidroliza a la prunasina liberando otra molécula de D-Glucosa mas (R)-Mandelonitrilo (1) (Fig. 6).

FACTORES QUE AFECTAN EL CONTENIDO DE GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS.

PREVENCIÓN DEL ENVENENAMIENTO

En diferentes variedades de una misma especie puede haber variaciones en el contenido de glucósidos cianogénicos, la variación puede estar influenciada por factores genéticos, la fase de desarrollo de la planta y la parte de la planta examinadas. En frijol de lima y linaza el cianuro se encuentra en todas las partes de la planta y en todas las etapas de su vida, así como en la semilla. El potencial mas alto de liberación de cianuro de frijol de lima se registra en las variedades de color negro. El cultivo sistemático de las variedades blancas, ha logrado disminuir grandemente el contenido potencial de

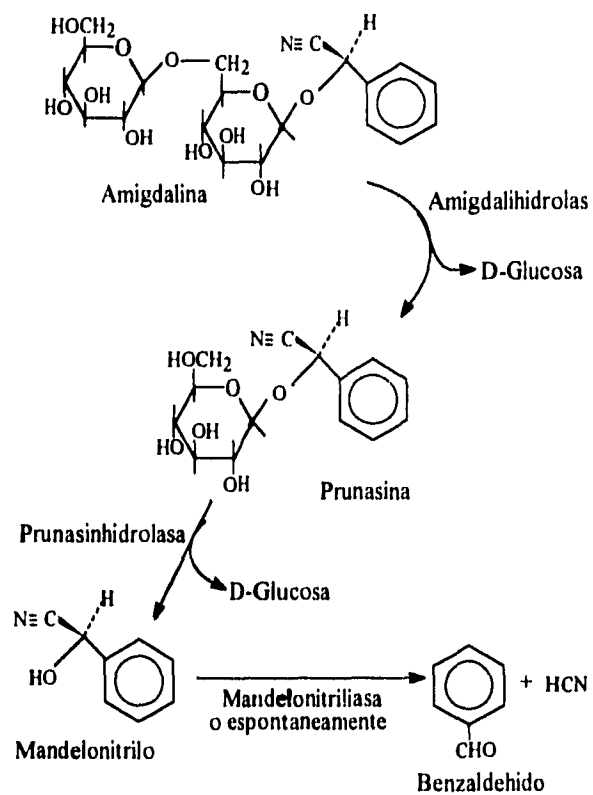


FIGURA 6 Hidrólisis de la Amigdalina

HCN, pero probablemente ninguna variedad que este totalmente libre de glucósidos cianogénicos pueda ser producida.

Los especímenes americanos tienden a poseer una menor cantidad de glucósidos cianogénicos que los originarios de África. En la cassava los mayores contenidos de glucósidos cianogénicos se encuentran en las variedades amargas, pero de hecho no hay una clara diferenciación entre los especímenes amargos y los dulces.

Ya que se conoce la forma como se libera el HCN a partir de los glucósidos cianogénicos, se entenderá, que entre otros factores, la forma de preparar un alimento que contenga este tipo de tóxico, es muy importante, y para que esto quede bien ilustrado se presenta el diagrama de la figura 7

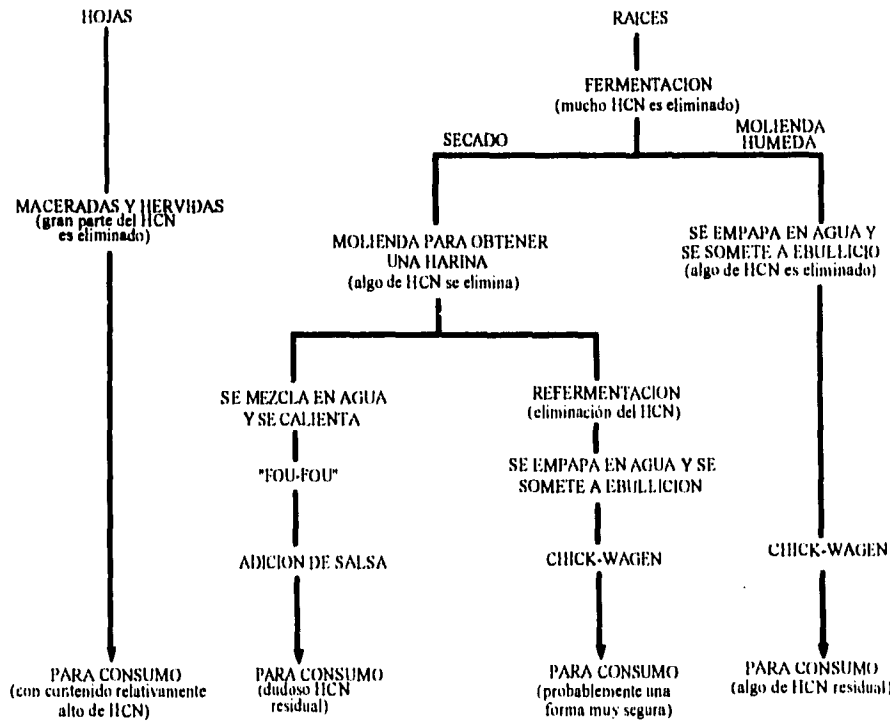


FIG. 7 Diagrama que muestra el uso de la cassava en Zaire (3)

Como se mencionó anteriormente la liberación del HCN depende de la presencia de la enzima glucosidasa y de un medio acuoso además de un daño físico a la planta para que se pongan en contacto sustrato y enzima.

La hidrólisis es mejorada si la planta es remojada en agua después de haber sido triturada; sin embargo, el magullamiento sin remojo liberará con el tiempo todo el contenido de HCN, por ello es bien sabido que la raíz de cassava magullada no es adecuada para su consumo, por lo tanto la liberación de ácido cianhídrico depende grandemente de las condiciones físicas.(3)

En cuanto al tratamiento previo que se le da a muchas plantas conteniendo glucósidos cianogénicos antes de ser consumidas, existe el cocimiento, en el cual el HCN que tiene un punto de ebullición relativamente bajo (26°C) se volatiliza rápidamente con la ebullición; sin embargo si el utensilio de cocina que se ocupa esta cubierto con una tapadera, el HCN se condensará y por consiguiente el agua de cocimiento estará fuertemente contaminada.

Cuando una planta ya se coció, permitiendo la volatilización del HCN, y ya se inactivó la enzima debido a su naturaleza proteica termolábil, no debe mezclarse con una planta fresca ya que la enzima activa de esta última puede hidrolizar a los glucósidos, que en contraste con la Glucosidasa son bastante estables al calor.

Hasta ahora hemos hablado solamente de la posibilidad de hidrólisis de los glucósidos cianogénicos antes de que el alimento conteniéndolos sea consumido, pero aún no se sabe a ciencia cierta si el consumo de la planta intacta o del mismo glucósido sean tóxicos después de ingerirse. Existen

reportes de que la Glucosidasa se inactiva con el pH de la saliva del ser humano o el pH del jugo gástrico, así como también con la presencia de celulosa o glucosa. Teóricamente es posible que una persona, particularmente desnutrida, que consuma apresuradamente una gran cantidad del vegetal cianogénico, presente una autólisis del glucósido en el estómago debido a que posee una baja acidez gástrica, hasta que la concentración fuera totalmente permeada por el jugo gástrico.

A pesar de estos hechos negativos, el efecto de la ingestión de los glucósidos cianogénicos permanece aún sin conocerse. En ciertas circunstancias, la microflora intestinal podría participar en la descomposición de estos compuestos.

Por lo anteriormente descrito, son evidentes las precauciones que deben tomarse para prevenir el envenenamiento con glucósidos cianogénicos. Debe asegurarse que el HCN liberado se haya eliminado con el cocimiento del alimento y que el agua utilizada para ello sea eliminada. Las plantas cianogénicas, no deben ser almacenadas por largos periodos y por supuesto debe evitarse cualquier daño físico a la planta ya sea en la cosecha o en su manejo en general.

IMPORTANCIA DE LOS GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS

La importancia del estudio y determinación de los glucósidos cianogénicos, reside principalmente en el potencial efecto tóxico que éstos producen al ser consumidos, ya sea por animales o por seres humanos, ya que como se mencionó anteriormente estos compuestos, al ser hidrolizados liberan entre sus productos de hidrólisis, ácido cianhídrico (HCN).

Debemos mencionar que en algunas legislaciones el contenido de glucósidos cianogénicos se limita a ciertos niveles en donde no se corra riesgo, así tenemos que en E.U y en algunos países europeos, para el caso de algunas semillas destinadas a la alimentación animal, su contenido no debe rebasar el nivel de 20mg HCN/ 100g de material seco. (11).

En la hidrólisis de los glucósidos cianogénicos, la liberación del HCN se produce en una relación estequiométrica 1:1 con respecto al glucósido que lo genera, lo anterior es la base de varios métodos para la cuantificación de este tipo de compuestos tóxicos.(3,6).

LA ENZIMA β -GLUCOSIDASA

Se ha citado ya anteriormente que las plantas que contienen glucósidos cianogénicos, contienen también al complejo enzimático capaz de hidrolizarlos y que aunque la enzima y el sustrato se encuentran en diferentes compartimentos, se pueden poner en contacto cuando se presenta ruptura celular; y se habla precisamente no de una sola β -Glucosidasa sino de un complejo enzimático compuesto de 2 enzimas que son la Amigdalín Hidrolasa (AH) y Prunasín Hidrolasa (PH), involucradas en la hidrólisis de la Amigdalina, cada una de las cuales al parecer posee múltiples formas, es decir, isoenzimas. Li Chun P., Swain E. y Poulton J.E. reportan 4 formas de la AH (AH^I, AH^{II}, AH^{III} y AH^{IV}) y tres formas de la PH (PH^I, PH^{IIa} y PH^{IIb}) que fueron purificadas por cromatografía a partir de homogenados de capulín maduro (*Prunus serotina*) y como la purificación se llevó a cabo en presencia de varios inhibidores de proteasas, ello sugiere que estas formas múltiples no se generaron por proteólisis durante la purificación, sin embargo no se descarta la posible modificación de cada enzima durante el aislamiento por enzimas que hidrolizan carbohidratos o glicopeptidasas (1)

La mayoría de las β -Glucosidasas parecen ser glicoproteínas; la β -Glucosidasa estudiada es efectivamente una glicoproteína y es una hidrolasa, es decir, una enzima hidrolítica.

Toda enzima posee un pH óptimo en el cual es más activa; el pH óptimo de la β -glucosidasa del capulín está en un rango que es el de 4.5 a 5.5, la

inactivación de la β -Glucosidasa es relativamente rápida a $\text{pH} > 8.2$ y $\text{pH} < 4$. Su temperatura óptima es de $(37-38)^\circ\text{C}$.

En lo que se refiere a actividad, ésta es una función del ambiente iónico. Con algunos cationes (adicionados como nitrato 0.08 M), el rango de hidrólisis es aproximadamente el doble, por ejemplo con Na^+ , K^+ , Rb^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Sr^{++} , Ba^{++} , lo mismo sucede con los aniones: I^- , $(\text{NO}_3)^-$, $(\text{ClO}_4)^-$, y $(\text{ClO}_3)^-$, adicionados como sales de amonio o potasio 0.08 M (7)

IMPORTANCIA DE LA β -GLUCOSIDASA

Dentro de los métodos desarrollados para la cuantificación de glucósidos cianogénicos, tenemos desde los gravimétricos, volumétricos y espectrofotométricos hasta el uso de cromatografía gaseosa (CG); y, en todos ellos se determinan los productos de la hidrólisis de estos compuestos, por lo cual es necesario la adición de una fuente de β -Glucosidasa exógena o externa. Precisamente en nuestro laboratorio se ha desarrollado un método espectrofotométrico relativamente sencillo para la determinación de estos compuestos (8); en el que efectivamente se utiliza una β -Glucosidasa para llevarlo a cabo, disponible comercialmente, la cual es de importación y demasiado costosa lo que en cierta medida limita su uso, por lo tanto he aquí una de las razones de la importancia de esta enzima.

La enzima β -Glucosidasa es también utilizada en el área industrial, como por ejemplo en la producción de glucosa a partir de celulosa: La celulosa es un polímero lineal de unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces $1,4\text{-}\beta\text{-D-}$

glucosídicos. El sistema enzimático para la conversión de celulosa a glucosa comprende una endo-1,4- β -Glucanasa (E.C 3.2.1.4), una Celobiohidrolasa (E.C 3.2.1.91) y una β -Glucosidasa (E.C 3.2.1.21), todas ellas actúan secuencial y cooperativamente para degradar la celulosa a glucosa. La endoglucanasa actúa de una manera desordenada en las regiones de baja cristalinidad de la fibra celulósica, mientras que la Celobiohidrolasa remueve las unidades de celobiosa de las terminaciones no reducidas de la cadena celulósica. La β -Glucosidasa hidroliza la celobiosa y en algunos casos también celooligosacáridos, convirtiéndolos en glucosa.

La β -Glucosidasa generalmente es responsable de la regulación de todo el proceso celulolítico y es un factor limitante durante la hidrólisis enzimática de la celulosa, ya que la actividad de las otras 2 enzimas es frecuentemente inhibida por la celobiosa.

Así que la β -Glucosidasa, no solo produce glucosa a partir de celulosa, sino que reduce además la inhibición por celobiosa, permitiendo a las enzimas celulolíticas actuar eficientemente.(9)

Otra de las aplicaciones de la β -Glucosidasa es dentro de la industria alimentaria, como lo es en el procesamiento de vinos y jugos: La enzima es capaz de transformar las antocianinas, pigmentos presentes en muchos vegetales y frutas, a antocianidinas y azúcares. El aglucón resultante es colorido y menos soluble que las antocianinas, por lo tanto tiende a precipitar haciendo al compuesto mas fácil de eliminar. También han sido reportados usos de esta enzima, en la producción de vinos blancos para enriquecer su aroma, ello como resultado de la hidrólisis de glucósidos monoterpénicos.

La enzima también puede ser usada en el procesamiento de jugos de naranja, de hecho la hidrólisis de las antocianinas y la eliminación de los aglucones insolubles, previenen el decoloramiento de los jugos.(10)

PURIFICACIÓN DE ENZIMAS

La enzimología ha tenido un rápido avance, sobre todo en los últimos años, pero el proceso de purificación de las enzimas empezó a intensificarse en 1920 con Willstätter y sus colegas. La primera enzima cristalizada fue la ureasa, obtenida por Sumner en 1926 a cuyos trabajos se fueron agregando los de otros investigadores como Northrop en enzimas proteolíticas.

Hoy en día se han logrado caracterizar completamente alrededor de 250 enzimas. (12,13)

FUENTE

Cuando se desea purificar una proteína, lo primero que debe establecerse es el objetivo, que actuará como determinante durante todo el proceso y que nos indicará el tipo de fuente que se utilizará para obtener la proteína.

Si uno desea estudiar una enzima en particular, como en nuestro caso, debe elegirse una fuente que obviamente la contenga, pero además en grandes cantidades y dicha fuente debe ser de fácil disponibilidad.

Una vez elegida la fuente, el siguiente paso es extraer a la enzima del tejido y proceder con la purificación, para lo cual se requiere de baños de hielo, cuartos fríos y centrifugas a bajas temperaturas. En general la mayoría de las enzimas son mas estables a estas temperaturas, cercanas a 0°C y el crecimiento microbiano puede ser demorado. Cuando se prepara el homogeneizado para la extracción, lo mejor es trabajar de una manera rápida y continua. (12,13)

RUPTURA CELULAR

El primer paso en la purificación es la ruptura de la membrana celular y la extracción de la enzima del tejido, si este es el caso, se puede realizar de diferentes maneras:

1. Medios mecánicos: Molinos de arena, agitación a alta velocidad con perlas de vidrio, homogeneizados con arena, oscilaciones sónicas o ultrasónicas.

2. Medios físicos: Tratamientos térmicos, por ejemplo congelación del tejido en N₂ líquido y moliendo mientras este aún congelado. choque osmótico.

3. Medios químicos: Solventes orgánicos (acetona, butanol, etc.). Detergentes.

4. Medios enzimáticos: Lisozima, papaína.

5. Combinación de algunos de los anteriores.

EXTRACCIÓN

La elección del fluido de extracción depende de cada enzima y el volumen que usualmente se utiliza es aproximadamente 3 veces mas que el volumen del tejido.

Estos fluidos de extracción, para enzimas vegetales, deben contener suficiente buffer y sal para mantener un pH alrededor del neutro y una fuerza iónica de 0.1 a 0.5. El hecho de controlar el pH, es para proteger a las enzimas de los ácidos liberados de las vacuolas durante la ruptura celular. Además en las células vegetales, se controla el pH para evitar la liberación de ácidos fenólicos que son muy agresivos al unirse a las proteínas.

En plantas que contienen compuestos fenólicos, se incorpora, en el homogeneizado de extracción, polietilenglicol o polivinilpirrolidona para proteger a las enzimas.

La fuerza iónica se necesita para liberar o desorber a las enzimas que se encuentran adheridas a la membrana.

Muchos tejidos contienen cantidades relativamente altas de enzimas proteolíticas por lo que la posibilidad de una proteólisis, incluyendo por supuesto la de la enzima que nos interesa, es un peligro, que se contrarresta trabajando tan rápido como sea posible a bajas temperaturas, o adicionando inhibidores de proteasas.(12,13)

RECOLECCIÓN

Después de que la enzima ha sido extraída del tejido, se procede a la llamada recolección; que es el proceso de separación de la fracción donde se encuentra la proteína de interés. Se puede encontrar en la fracción sobrenadante en forma soluble o precipitada, por lo que la centrifugación (de 10000 a 20000 g de 20 a 30 min.), usualmente a bajas temperaturas, es un paso casi de rutina para la separación de las 2 fracciones, que también dependerá de la naturaleza de la proteína, de la fuerza, y tiempo de centrifugación, siendo un caso especial cuando las proteínas se encuentran asociadas a organelos subcelulares, lo cual requerirá probablemente de una combinación de métodos de ruptura celular, en algunos casos mas drásticos. Sin embargo, la centrifugación selectiva puede ser muy útil para separar los distintos organelos celulares antes de proceder al fraccionamiento.(12,13)

METODOS DE FRACCIONAMIENTO

Lo fundamental de la purificación consiste en una serie de fraccionamientos por los cuales la proteína se separa de la presencia de otras proteínas.

Una vez que se tiene la proteína en solución, se somete a un fraccionamiento basado en las siguientes propiedades:

- Solubilidad
- Carga
- Tamaño
- Actividad biológica
- Combinación de algunas de ellas.

Es recomendable hacer pequeñas pruebas piloto antes de trabajar con todo el extracto y tener presente que algunos métodos son casi imposibles de llevar a cabo en gran escala.

Siempre hay que tomar en cuenta 2 parámetros constantes, además de los que implica el tipo de fraccionamiento, que son el pH y la concentración de electrolitos.(12,13)

UNIDADES

Conviene definir algunos términos que expresen las cantidades de la enzima en función de la velocidad de la reacción de una cantidad dada de preparación enzimática. Las 3 cantidades definidas por la Comisión de

Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica se basan en la idea de la unidad "estándar" de enzima.

Unidad (U). Se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 micromol de sustrato por minuto en condiciones definidas.

Actividad específica. Se expresa en unidades de enzima por miligramo de proteína.

Actividad molecular. Se expresa en unidades por micromol de enzima a concentración óptima de sustrato. (12,13)

CRITERIO DE AVANCE

El éxito de cada paso en el proceso de purificación debe ser monitoreado determinando la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Existen varios métodos para determinar la concentración de la proteína total. El método elegido debe ser relativamente preciso, rápido y de preferencia no debe requerir gran cantidad de muestra. Cada uno de estos métodos presenta ventajas y desventajas, a saber:

Método de Kjeldahl- Existe el macro-Kjeldahl que requiere varios cientos de miligramos de proteína, y el micro-Kjeldahl que se reduce a décimas de mg de muestra. Ambos se basan en la oxidación de la materia orgánica con soluciones concentradas de H_2SO_4 , H_2O_2 , $HClO_4$ etc. que pueden formar, por ejemplo amoníaco (NH_3) que se cuantifica posteriormente y la cantidad de proteína se calcula multiplicando la cantidad de Nitrógeno encontrado en la muestra por el factor 6.25. Este factor representa cierto margen de error ya que asume que todas las proteínas tienen un contenido de Nitrógeno de 16%, que

sería el contenido promedio de Nitrógeno ($100\%/16\%=6.25$). Las proteínas varían en su contenido de N_2 desde 13 a 19%

Algunas de las desventajas de este método son, que las sustancias nitrogenadas no proteicas pueden contribuir a que se haga una estimación errónea, que es un método destructivo, que el tiempo requerido para la digestión y los análisis es relativamente largo, que si durante la purificación se adicionó sulfato de amonio, éste debe ser rigurosamente removido y con respecto a esto, la eliminación de sustancias contaminantes no proteicas haría este método demasiado lento.

Método de Biuret- Es uno de los mas utilizados, esta basado en la reacción del Cu^{2+} en solución alcalina, con los enlaces peptídicos de la proteína, para producir color y por tanto puede leerse la absorción a 540 nm. Requiere aproximadamente 1 a 10 mg. de proteína por ensayo, aunque existe el micro-Biuret que requiere de 0.2 a 4 mg. de proteína. Debido a que todas las proteínas contienen aproximadamente el mismo número de enlaces peptídicos, por unidad de peso de proteína, el valor de la lectura (absorbancia) es esencialmente independiente de la naturaleza de la proteína. Además son métodos altamente reproducibles.

El método se estandariza contra una solución de contenido proteico conocido; usualmente se utiliza albúmina sérica bovina cristalizada como proteína estándar.

Método de Lowry- Se basa en la reacción del fosfomolibdato, en solución alcalina, con los residuos de tirosil de las proteínas; también se utiliza Cu^{2+} para incrementar la sensibilidad de la reacción. El color azul que se forma

es bastante estable y tiene un máximo de absorbancia a 700 nm., aunque se lee frecuentemente a 600 nm.

En cuanto a la cantidad de proteína que se necesita para cada ensayo, ésta es tan pequeña como 5 a 40 mg, así que este método es 200 a 1000 veces más sensible comparado con el anterior y además es muy adecuado cuando no se cuenta con gran cantidad de muestra.

Tiene la desventaja de que los resultados son dependientes de la naturaleza de la proteína en cuanto que el contenido de tirosina de las proteínas varía marcadamente. La albúmina sérica bovina es usada como estándar.

Método de Folin-Ciocalteu- Se fundamenta en la naturaleza cromogénica de las cadenas laterales de aminoácidos. Se requieren cantidades de muestra de 10-100 mg. (12,13)

CRITERIO DE PUREZA

Una vez obtenido el producto final, probablemente no exista una prueba que por sí sola garantice que se trata de una proteína. Sin embargo, hay una serie de pruebas que establecen cierto grado de probabilidad y, si la muestra resulta ser homogénea en distintas pruebas (de preferencia que manifieste una homogeneidad respecto a distintos parámetros físicos como carga, pH, tamaño, etc.), la probabilidad se hace tan grande que es válido aceptar que la enzima es pura.

La mayoría de las pruebas de homogeneidad empleadas están basadas en sus propiedades físicas y, en general, son comunes a todas las proteínas; de ellas, las más usadas son: Ultracentrifugación analítica, Electroforesis, Técnica de Electroenfoque, Solubilidad. (12,13)

CAPITULO II

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL UTILIZADO

Se eligió como fuente para la extracción de la β -Glucosidasa la semilla de capulín, ya que nuestro país se encuentra en una posición ventajosa en lo que a riqueza de especies vegetales se refiere y precisamente la planta de capulín (*Prunus serotina*), se encuentra en abundancia en México y por experiencia personal y algunos datos bibliográficos, se sabe que esta planta presenta un alto contenido de glucósidos cianogénicos y también una alta actividad de β -Glucosidasa.

Las semillas de capulín, fueron adquiridas en la central de abastos de México, D.F, y sin despojarlas de la cáscara que cubre a la almendra, fueron almacenadas en un recipiente de plástico con nitrógeno, para disminuir el oxígeno de esa atmósfera y prevenir así un enranciamiento prematuro por oxidación de las grasas, y evitar también el desarrollo de microorganismos y/o insectos.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Las semillas fueron despojadas de la cáscara que cubre a las almendras para obtener éstas últimas, sin desechar la cubierta ya que se obtuvo el porcentaje de almendra y cáscara de la semilla de capulín. Cuando se haya realizado algún tratamiento especial para algún paso en particular, se mencionará en el párrafo correspondiente.

METODO GENERAL DE TRABAJO

A continuación en la figura 8, se muestra en forma de diagrama de bloques el desarrollo del presente trabajo

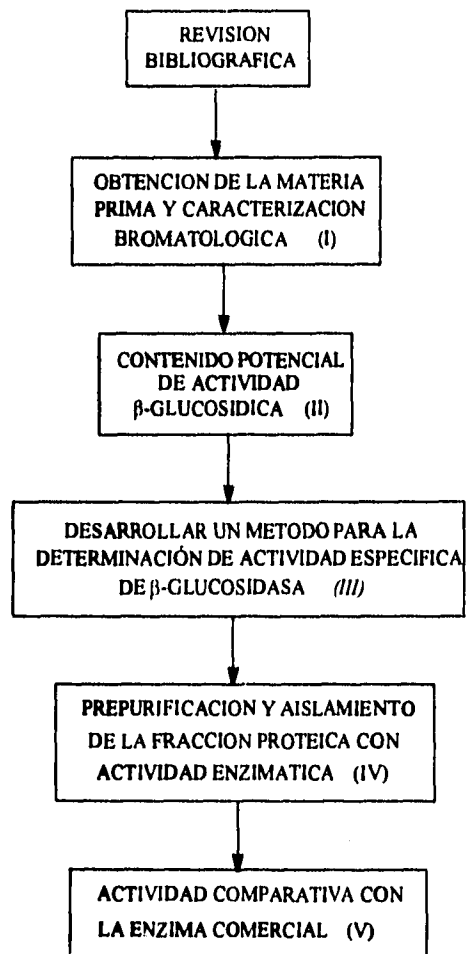


FIG.8 DESARROLLO DEL PLAN DE TRABAJO POR BLOQUES

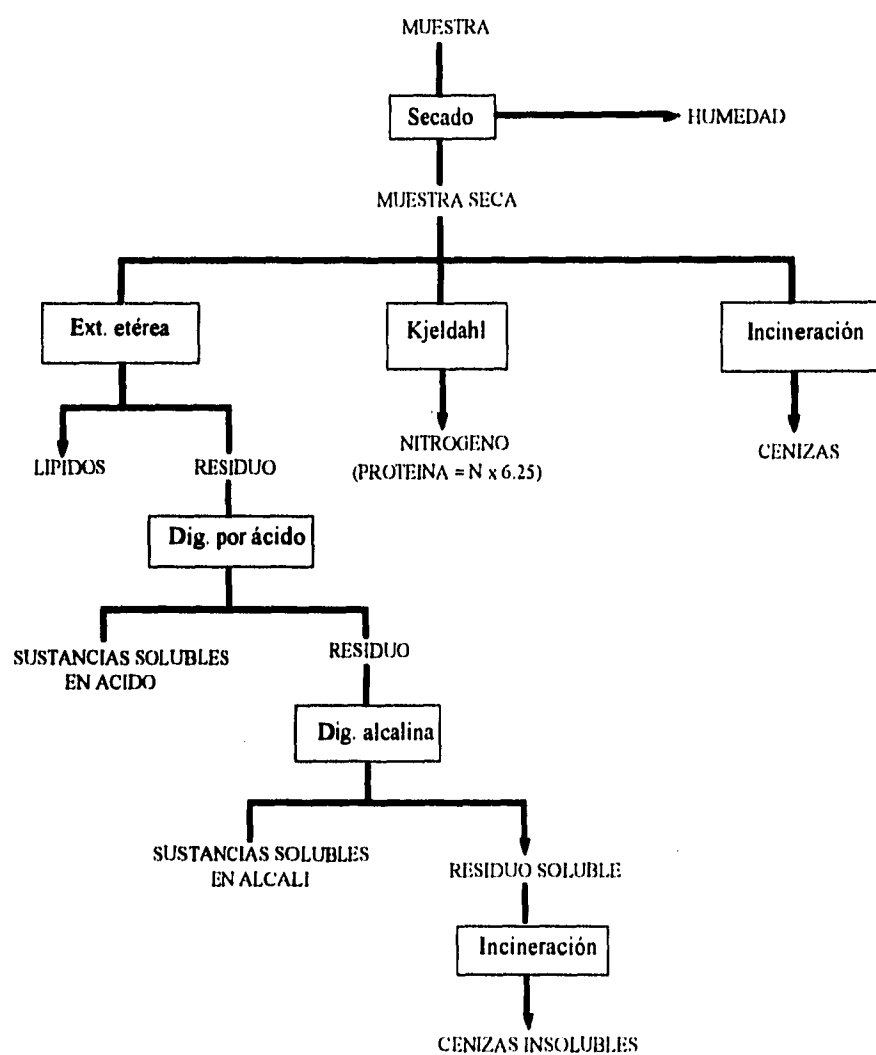
La revisión bibliográfica, fue de tipo retrospectivo ya que a lo largo del desarrollo experimental, fue necesario volver a ella con el fin de realizar nuevas consultas y actualizaciones.

Como primer paso se realizó el análisis bromatológico, también conocido como análisis proximal, de las almendras, éste se realizó bajo el esquema propuesto por Weende (14) y que se describe en la figura 9.

Para realizar las determinaciones consideradas en dicho esquema se siguieron las técnicas reportadas en el AOAC (15), con ligeras modificaciones: En el caso del análisis de proteína cruda, la digestión se realizó en un digestor de placa múltiple y la destilación se realizó en un microdestilador Labconco, y para la determinación de fibra cruda, aunque se realizó de acuerdo a la técnica original ésta se llevó a cabo en un sistema de digestión Labconco y se utilizaron, en la filtración, embudos tipo California.

Como segundo paso se procedió a la determinación del contenido potencial de β -Glucosidasa en la semilla de capulín por medio de la determinación de glucósidos cianogénicos tomando como referencia la metodología desarrollada en nuestro laboratorio (descrita en la pág.36), que nos sirve para detectar tanto cualitativamente como cuantitativamente la presencia de dichos compuestos en semillas de leguminosas (8). Se espera no encontrar diferencia estadísticamente significativa entre el contenido de glucósidos cianogénicos (expresado como mg HCN/100g de muestra) en la almendra de capulín, con y sin adición de β -Glucosidasa externa.

El tercer paso fue el desarrollo de un micrométodo para la determinación de actividad enzimática de β -Glucosidasa, la cual se decidió monitorear a través de la aparición de producto; en este caso glucosa, que se consideró muy



Fibra = Residuo insoluble-cenizas insolubles
 Carbohidratos asimilables por diferencia (CHO)
 (CHO) = Muestra seca - (Lípidos + cenizas + proteína + fibra)

FIGURA 9 Diagrama para realizar el análisis bromatológico (14)

conveniente puesto que este método ha sido establecido como el mas específico de los métodos no enzimáticos para tal objetivo. El método es simple, rápido y sensible a causa del color azul intenso que desarrolla. (16)

Adicionalmente, para saber que estamos llevando a cabo un adecuado proceso de purificación de nuestra enzima, es necesario determinar la actividad específica, para lo cual es indispensable la cuantificación de proteína, que en el presente trabajo se llevó a cabo por el método de Kjeldahl para las almendras de las que se partió y por el método de Lowry para el caso de la harina de almendras de capulín desengrasada (HACD), para el dializado y para el liofilizado que se obtienen durante la purificación.

El cuarto paso, que es precisamente proceder con la purificación de la proteína, y el quinto paso se verán mas adelante.

En cuanto al desarrollo, anteriormente se mencionó que el monitoreo de la actividad enzimática se llevó a cabo por medio de la determinación de glucosa, que es uno de los productos de la hidrólisis de los glucósidos cianogénicos, pero vale la pena mencionar que esto fue factible porque antes de tomar tal decisión se realizó la cuantificación de glucosa libre que pudiese tener *per se* la almendra de semilla de capulín; ya que si ésta hubiese resultado ser una cantidad muy grande, habria interferido en la determinación de la actividad enzimática, causando problemas en el monitoreo por medio de la cuantificación de este producto. Para conocer este dato se trató la muestra de la siguiente forma: 1° se inactivó la β -Glucosidasa endógena de las almendras (aprox. 15g), dándoles un tratamiento térmico en autoclave a 121°C/15 min. y después se trituraron y desengrasaron por el método de soxhlet (15) utilizando hexano como disolvente en vez de éter etílico, porque su manejo es menos riesgoso, sin

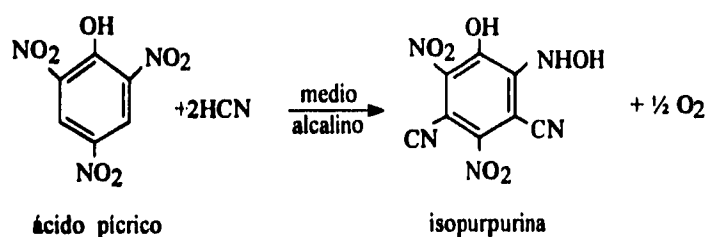
importar que la temperatura de ebullición del hexano, que es mayor a la del éter inactivara la enzima endógena ya que incluso éste es uno de los fines que se persiguen para que no existan errores en la determinación de glucosa libre total.

Después se procedió a la determinación de glucosa.

MÉTODOS

Método para la determinación de glucósidos cianogénicos.

Fundamento: El presente método aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, la que es ampliamente utilizada en pruebas cualitativas para la detección tanto de glucósidos cianogénicos como del propio HCN. Para cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática del correspondiente glucósido cianogénico.(adición de β -Glucosidasa)



La sensibilidad de este método es muy alta; puede detectar hasta $5\mu\text{g}$ de HCN.

Equipo y material especial:

Incubadora marca BLUE M

Congelador comercial

Espectrofotómetro Sequoia-Turner mod.340

Baño de agua con agitación LAB-LINE No.3575

Tubos de cultivo con tapón de rosca PYREX #9826

Molino marca Cyclone

Fotoceldas 19x105 (Coleman)

Reactivos y soluciones:

Fécula de maíz comercial o dextrina

Solución de KCN equivalente a 100 $\mu\text{gHCN/ml}$.

HCl 0.5N

Buffer de fosfatos pH 7.00 (Merck 9439)

Papel indicador de HCN (a)

Solución de β -Glucosidasa con activador (b)

Solución de picrato de sodio alcalinizada (c)

Preparación de soluciones:

(a) Papel filtro Whatman del #2, se empapa en una solución de picrato de sodio (c), se seca en una estufa a una temperatura de 55-60°C/30 min. y se cortan tiras medidas de 2x10 cm.

(b) 0.25g de β -Glucosidasa comercial, se disuelven con buffer de fosfatos pH 7.00, agitando con precaución (de lo contrario se formará una gran cantidad de espuma). Una vez disuelta la enzima, se le adiciona 1.7g de NaNO_3 que actúa como activador de dicha enzima, todo lo anterior se lleva a un volumen de 250 ml. con el mismo buffer y así tenemos una concentración de 1 mg de β -Glucosidasa/ml. y 0.08 M de NaNO_3 .

(c) Se disuelven en agua destilada 2.5g de ácido pícrico y a continuación 12.5g de carbonato de sodio, llevándose a un volumen de 500 ml. también con agua destilada.

Procedimiento: Curva estándar: Para la elaboración de nuestra curva de referencia, se usa la solución de KCN. Además con el fin de simular la interacción muestra-HCN liberada, se introduce en nuestra curva estándar la llamada matriz alimenticia (Harris y col. 1980), en nuestro caso se usa fécula de maíz comercial o dextrina

TUBOS PARA LA CURVA ESTÁNDAR:

ml. soln. estándar	matriz aliment.	Buffer pH7	$\xrightarrow[40']{40^\circ \text{ C tiempo}}$	HCl 0.5N (en frío)	Concentración de HCN (μg)
0.00	500mg	5.0 ml		1 ml.	BLANCO
0.05	"	"		"	5.0
0.10	"	"		"	10.0
0.20	"	"		"	20.0
0.40	"	"		"	40.0
0.60	"	"		"	60.0

La curva estándar va de 5 a 60 μg de HCN ya que fue el rango óptimo encontrado en la respuesta concentración de HCN vs D.O ($r=0.99$) en donde se cumple la ley de Lambert-Beert. Dicha serie de tubos se trabajan en la misma forma que para la liberación de HCN en la muestra.

Preparación de la muestra: El material integro fresco se somete a una molienda fina (molino Cyclone), e inmediatamente se pasa a un frasco que

cierre perfectamente y si no se va a realizar en ese momento la determinación, se procede a colocar la muestra ya molida en el congelador.

Liberación del HCN de la muestra: Se colocan en un tubo de cultivo (Pyrex) 0.01 g (10mg) de muestra; a continuación se le adicionan 5.0 ml. de solución de β -Glucosidasa. (fria) se homogeniza y se procede a colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con 8 gotas de agua) en la boca del tubo con una orilla prensada cuando se cierre herméticamente con el tapón de rosca.

Una vez que se tiene el anterior dispositivo se colocan en el baño maría que está a una temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5 por espacio de 4 hrs. Al final de dicho tiempo se saca el tubo y se coloca en el congelador por 30 min. Después se saca el tubo del congelador y se destapa para adicionarle 1ml de HCl 0.5N (frio); hay que hacer notar que si se usan los tapones adecuados, la tira de papel indicador quedará adherida a dicho tapón y no se presentarán problemas de manipulación en este paso.

Una vez adicionado el HCl, se vuelve a cerrar perfectamente, se homogeniza teniendo la precaución de que el liquido no toque el papel indicador y se coloca en la incubadora por espacio de 15 min. a la temperatura de 60°C . Transcurrido el tiempo, se saca de la incubadora y en ese momento se puede realizar visualmente la detección cualitativa, que se manifiesta porque el papel indicador muestra una coloración café-rojiza; entonces se procede a la detección cuantitativa.: Con cuidado se recupera el papel indicador y se coloca en un tubo de cultivo (Pyrex), se le adicionan 20 ml. de agua destilada (medidos con bureta) se tapa y se agita vigorosamente

con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papel indicador en el agua.

Después de extraer el pigmento (aprox. de 2 a 5 min.) se recupera el solvente (agua), eliminando los residuos de papel por una simple filtración con papel de filtración rápida. Cuando así se requiera se puede hacer una nueva adición de agua (20 ml.) para extraer completamente el pigmento (dilución).

La solución filtrada se coloca en la fotocelda, para su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm; previamente ajustado a 100% T con el blanco correspondiente (todos los reactivos excepto la muestra).

Método para la determinación de glucosa

Fundamento: Una disolución de o-toluidina en ácido acético glacial cuando se calienta con la glucosa da lugar a un producto coloreado con un máximo de absorción a 630 nm. El grupo aldehído de la glucosa se condensa con el reactivo para formar primero glucosilamina y posteriormente un producto coloreado denominado genéricamente base de Schiff.

Equipo y material especial:

Digestor Supelco

Espectrofotómetro Sequoia-Turner mod. 340

Tubos de rosca Pyrex # 9825

Tapones de rosca con cubierta de teflón

Pipeta automática Labsystems de 200- 1000 μ l

Reactivos* y soluciones:

Solución de ácido benzoico (d)

Patrón de reserva de glucosa (e)

Patrones de trabajo de glucosa (f)

Reactivo de coloración de o-toluidina (Merck 3306)

Preparación de soluciones:

(d) Disolver 1.4 g de ácido benzoico en 800 ml. de agua desionizada con calentamiento, dejar enfriar y aforar a 1000 ml.

(e) Disolver 250 mg de glucosa en 200 ml. de disolución de ácido benzoico y aforar a 250 ml. con la misma disolución.

(f) Tomar alícuotas de 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5 y 25 ml. del patrón de reserva de glucosa, y aforar cada una a 50 ml. con ácido benzoico.

*Todos los reactivos utilizados en todos los métodos son grado analítico (R.A)

Procedimiento: Se pipetea 3 ml. del reactivo de coloración en una serie de tubos de vidrio, preferentemente con tapas de rosca forradas de teflón. Con micropipetas se añaden a los tubos 500 µl (0.5ml.) de la solución problema*. Para el blanco se adicionan 500 µl de solución de ácido benzoico en vez de la muestra. Se mezcla el contenido de cada tubo, se tapan y se calientan en un digestor a 100°C durante 13 minutos. Se retiran al cabo de este tiempo y se enfrían en baño de agua helada hasta que alcancen la temperatura ambiente. Se lee la absorbancia del contenido de cada tubo frente al blanco a 630 nm.

* Para este trabajo, para el caso específico de la determinación de glucosa libre de la harina de almendra de capulín desengrasada, la solución problema se preparó de la siguiente manera: Se pesó 1g de harina desengrasada y se disolvió en 100 ml. de una mezcla agua:etanol 90:10 (v/v) con agitación a 200 rpm. durante 2 horas. con el fin de extraer el azúcar de la muestra. Finalmente se procedió a hacer una filtración.

Para la elaboración de la curva patrón, se sigue el mismo procedimiento, utilizando como muestras los diferentes patrones de trabajo de glucosa y se grafica concentración de glucosa contra absorbancia.

Curva de actividad de la β - Glucosidasa comercial

Fundamento: la hidrólisis de amigdalina por acción de la β -Glucosidasa da como resultado la liberación estequiométrica de HCN (relación 1:1) y 2 moles de glucosa, la cual puede ser cuantificada por diferentes métodos, y en este caso se eligió el de la reacción con o-toluidina. Dentro de un cierto rango, es decir, hasta que se llega al límite, a mayor tiempo de reacción, mayor liberación de glucosa, teniéndose control sobre concentración de sustrato (amigdalina) y enzima, así como del pH, temperatura y adición de ciertos activadores.

La actividad se expresa en unidades de actividad (U) (cap.I revisión de tecnología enzimática, ver "unidades" pág 26)

Equipo y material especial:

Baño de agua con reóstato Grant

Vortex Lab-line con control de agitación

Pipeta automática Labsystems de 200-1000 μ l

Cronómetro

Potenciómetro Corning mod.10

Reactivos y soluciones:

Ácido acético al 18 %

Amigdalina (Sigma cat. A 6005)

β -Glucosidasa (Sigma cat. G-0395)

Nitrato de sodio

Buffer de citrato-fosfato pH 5.0 $\pm$ 0.1 (g)

Solución de amigdalina (h)

solución de β -glucosidasa comercial (i)

Preparación de soluciones:

(g) Mezclar 243 ml. de una solución 0.1 M de ácido cítrico (19.21 g en 1000 ml.) con 257 ml. de una solución 0.2 M de fosfato dibásico de sodio (53.65g de $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ó 71.7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 1000 ml.) y aforar a 1000 ml.. Ajustar el pH, si es necesario.

(h) Se pesan 76.25 mg. de amigdalina y se aforan a 100 ml con buffer de citrato-fosfato pH 5.0

(y) Mezclar 10.25 mg de β - Glucosidasa y 0.68 g de NaNO_3 (concentración 0.08 M) y aforar a 500 ml. con buffer de citrato-fosfato pH 5.0.

Procedimiento: Todos los reactivos deben estar preincubados a 37°C. Con micropipeta, se adiciona 1 ml. de solución de β -Glucosidasa en una serie de 8 tubos de ensaye (mínimo por duplicado). Se colocan los tubos en un baño de agua a 37°C. Al primer tubo se le adiciona 1 ml. de ácido acético, y posteriormente 4 ml. de solución de amigdalina; ésto con el objetivo de que se inactive la enzima antes de entrar en contacto con el sustrato. Este tubo corresponde al tiempo cero de reacción.

al segundo tubo se le adicionan 4 ml. de solución de amigdalina, midiendo con cronómetro el tiempo de reacción. A los 10 minutos exactos se para la reacción adicionando 1 ml. de ácido acético, se saca el tubo del baño y se mezcla perfectamente el contenido del tubo utilizando un "vortex".

Se sigue el mismo procedimiento del segundo tubo con los 6 tubos restantes, pero deteniendo la reacción a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos, respectivamente.

Finalmente, de cada tubo se toma una alícuota de 0.5 ml. a la cual se le determina glucosa por el método de la o-toluidina (descrito en la pág. 43)

Actividad de la β -Glucosidasa endógena

El fundamento, equipo, material, reactivos y soluciones son exactamente los mismos que los de la curva de actividad de la β -Glucosidasa comercial (descritos anteriormente en la pág. 45), con excepción de la propia β -Glucosidasa comercial y su respectiva solución que en este caso no se requieren, puesto que se va a estudiar la enzima que contienen las almendras de capulín *per se*.

Procedimiento: Es esencialmente el mismo que el de la curva de actividad de la Glucosidasa comercial, bajo las mismas condiciones de: Temperatura=37°C, pH=5.0 $\pm$ 0.1, Volumen total del sistema=6 ml., y el tiempo de reacción óptimo que fue de 45 minutos.

En vista de que la cantidad a utilizar de muestra (harina de almendras de capulín), será la que sustituirá a la enzima comercial; se adiciona una cantidad que asegure contener la misma concentración que la β -Glucosidasa comercial utilizada en la curva de actividad de ésta, incluso aún mas, puesto que no toda la proteína que contiene la almendra es β -Glucosidasa así que se decidió utilizar 10 veces mas de proteína, por lo tanto, se manejó un peso de 0.6 mg. de muestra disueltos en 1 ml. de buffer pH 5.0, por cada tubo de reacción. Ésto será el sustituto de la solución de β -Glucosidasa comercial.

El experimento se realizó con 2 blancos (tubos de tiempo cero), y mínimo por triplicado; para después de 45 minutos de reacción y haberla detenido con ácido acético al 18%, proceder a tomar una alícuota de 0.5 ml. de

cada tubo, a las que se les determina glucosa por el método de la o-toluidina (descrito en la página43).

También se les realizó a las almendras la determinación de proteína, por el método micro-Kjeldahl (15), para poder calcular la actividad específica de éstas que son la materia prima de referencia, es decir, de la que se partirá para llevar a cabo la obtención del extracto enzimático semipurificado.

Determinación de proteína

Modificación del método de Lowry que da una respuesta fotométrica lineal (17)

Fundamento: Consultarlo en el capítulo primero, (purificación de enzimas), del presente trabajo.

Equipo y material especial:

Tubos Pyrex # 9800

Baño de agua con reóstato Grant

Pipeta automática Labsystems de 200-1000 µl.

Pipeta automática Labsystems de 50-100 µl.

Cronómetro

Espectrofotómetro Sequoia-Turner mod. 340

Fotoceldas 19x105 mm. (Coleman)

Reactivos y soluciones:

Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma)

Hidróxido de sodio 1N

albúmina bovina (Sigma cat.A-3425)

Solución A; de tartrato de sodio, y potasio y carbonato (j)

Solución B; de tartrato de sodio y potasio y sulfato de cobre (k)

Solución C (l)

Preparación de soluciones:

(j) Solución A: Se disuelven 2 g. de tartrato de sodio y potasio y 100 g. de Na_2CO_3 en 500 ml. de sosa 1N para después aforar a 1000 ml.

(k) Solución B: Se disuelven 2 g. de tartrato de sodio y potasio y 1 g. de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 90 ml. de H_2O para aforar después a 100 ml. con NaOH 1N.

(l) Solución C: 1 volumen del reactivo de Folin-Ciocalteu, se diluye con 15 volúmenes de H_2O . Esta solución se prepara diariamente y debe tener una normalidad entre 0.15 N y 0.18 N cuando se titula a pH 10 con sosa 1N. Si la acidez fuese mayor a 0.18 N deberá ser ajustada con sosa (generalmente este ajuste no es necesario)

El hecho de dividir el tartrato entre las soluciones A y B previene la cristalización en B y mantiene la concentración necesaria de tartrato para el ensayo.

Las soluciones A y B, almacenadas en recipientes de polietileno a temperatura ambiente, permanecen estables y tienen una caducidad de al menos 6 meses.

Procedimiento: Curva estándar: Se utiliza una solución de albúmina bovina cuya concentración equivalga a 360 $\mu\text{g}/\text{ml}$. de H_2O destilada.

La curva estándar va de 36- 324 μg . de proteína (albúmina bovina) donde se cumple la ley de Lambert-Beer. Y esta serie de tubos se trabaja en la misma forma que las muestras de proteína problema:

Las muestras problema se diluyen con 1 ml. de agua destilada, se colocan en tubos con su correspondiente etiqueta y se les adicionan 0.9 ml. de la solución A con agitación para que se mezclen, a continuación se colocan en un

baño de agua a 50°C durante 10 minutos, después de los cuales se retiran del baño hasta que vuelvan a alcanzar la temperatura ambiente (21-25°C, en aproximadamente 10 min.), y puedan ser tratados con 1 ml. de la solución B; los tubos se dejan a la temperatura ambiente al menos 10 minutos y después se tratan con 3 ml. de la solución C; que es adicionada de manera rápida y con cierta presión para asegurar que se mezclen en cuestión de 1 a 2 segundos. Los tubos son de nuevo colocados en el baño de agua a 50°C/10 minutos y enfriados a temperatura ambiente, para finalmente proceder a la lectura de las absorbancias a 650 nm.

TUBOS PARA LA CURVA ESTÁNDAR:

Tubo#	ml.soln. estándar.	ml. H ₂ O-----	Conc. proteína.µg.
Blanco	0.0	1.0	0
2	0.1	0.9	36
3	0.2	0.8	72
4	0.3	0.7	108
5	0.4	0.6	144
6	0.5	0.5	180
7	0.6	0.4	216
8	0.7	0.3	252
9	0.8	0.2	288
10	0.9	0.1	324

OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO SEMIPURIFICADO CON ACTIVIDAD DE β -GLUCOSIDASA

Tratamiento de la muestra:

Ya que se trabaja con la almendra de la semilla de capulín, fue necesario desengrasarla con la finalidad de eliminar esta fracción que podría interferir en el proceso de purificación. Por lo tanto las almendras se separaron de sus respectivas cáscaras, hasta tener aproximadamente 150 g. de ellas, se fraccionaron con una navaja para colocarlas en un sistema de extracción Soxhlet, siguiendo el procedimiento del AOAC (15), y utilizando como disolvente éter etílico, que posee un adecuado punto de bullición (bajo) para evitar que se inactiven térmicamente las proteínas, especialmente la β Glucosidasa.

Se controló la temperatura del proceso de desengrasado, que duró alrededor de 16 horas, de tal manera que siempre estuvo entre 25 y 28 °C.

Ya que la temperatura puede aumentar la actividad enzimática y probablemente la acción de proteasas endógenas que pudieran inactivar a la β -Glucosidasa; se asume que lo anterior se evita con ciertas condiciones a favor como que la almendra tiene un bajo contenido de agua y en el desengrasado se usa un disolvente no-polar, que no propicia una proteólisis. Sin embargo, se evaluó si este proceso de semipurificación no afectó la actividad enzimática original.

La muestra desengrasada se molió finamente con la ayuda del molino "Cyclone" y utilizando la malla mas fina (1mm. de diámetro), para obtener la harina desengrasada con la que se trabajó para la purificación.

Purificación

Equipo y material especial:

Centrífuga marca Beckman J2-MC

Filtro: Tela de algodón de 36 hilos x pulgada

Membranas de celulosa para diálisis con poder de retención de moléculas de peso molecular ≥ 12000 (Sigma cat.D-9402)

Liofilizadora marca Labconco mod. 5

Reactivos y soluciones:

Arena limpia

Histidina

HCl concentrado

HCl al 10%

NaCl

Solución de sulfuro de sodio 0.3% (p/v)

Solución de ácido sulfúrico 0.2% (v/v)

Polyclar purificado (Polivinilpolipirrolidona) (m)

Membranas de celulosa para diálisis, tratadas (n)

Buffer A; 0.1M=100mM histidina-HCl pH 6.0 (ñ)

Buffer B; 10mM histidina-HCl, conteniéndolo 0.17 M de NaCl (o)

Preparación de soluciones:

(m) El polyclar, cuya función es eliminar compuestos fenólicos, debe ser tratado con ácido y agua para eliminar partículas solubles que pudieran

contaminar. Se calienta el polyclar con HCl al 10 % (temperatura aproximada 70°C) durante 10 minutos, enseguida se elimina el sobrenadante y se realizan cuantos enjuagues sean necesarios, hasta que el sobrenadante quede claro.

(n) Antes de poder utilizar estas membranas; deben ser tratadas de la siguiente forma:

n.i- Remover la glicerina (que trae incluida como humectante la membrana) lavándola con agua de la llave, que este circulando durante 3-4 horas.

n.ii- Remover sulfuros tratando la membrana con la solución de sulfuro de sodio 0.3% a 80°C durante 1 minuto.

n.iii- Lavar con agua caliente (60 °C) durante 2 minutos.

n.iv- Acidificar con la solución de ácido sulfúrico 0.2%, enjuagar con agua caliente para remover el ácido, hasta cerciorarse de que el agua de enjuague no tenga un pH ácido.

(ñ) Disolver 31.02 g. de histidina en aproximadamente 1800 ml. de agua desionizada y ajustar el pH a 6.0 con HCl, completar el volumen de 2 litros con agua desionizada.

(o) Disolver 78.4 g. de NaCl en 800 ml. del buffer A, llevar a un volumen aproximado de 7000 ml. y ajustar el pH a 6.0 con HCl y completar un volumen de 8000 ml. con agua desionizada.

Procedimiento: Se pesaron 30g de harina de capulín desengrasada y se homogenizaron con agitación constante durante 1½ horas, junto con 4 g. de polyclar, 8 g. de arena limpia y 100 ml. del buffer A (ajustar el pH de este homogeneizado a pH 6.0, si es necesario)

contaminar. Se calienta el polyclar con HCl al 10 % (temperatura aproximada 70°C) durante 10 minutos, enseguida se elimina el sobrenadante y se realizan cuantos enjuagues sean necesarios, hasta que el sobrenadante quede claro.

(n) Antes de poder utilizar estas membranas; deben ser tratadas de la siguiente forma:

n.i- Remover la glicerina (que trae incluida como humectante la membrana) lavándola con agua de la llave, que este circulando durante 3-4 horas.

n.ii- Remover sulfuros tratando la membrana con la solución de sulfuro de sodio 0.3% a 80°C durante 1 minuto.

n.iii- Lavar con agua caliente (60 °C) durante 2 minutos.

n.iv- Acidificar con la solución de ácido sulfúrico 0.2%, enjuagar con agua caliente para remover el ácido, hasta cerciorarse de que el agua de enjuague no tenga un pH ácido.

(ñ) Disolver 31.02 g. de histidina en aproximadamente 1800 ml. de agua desionizada y ajustar el pH a 6.0 con HCl, completar el volumen de 2 litros con agua desionizada.

(o) Disolver 78.4 g. de NaCl en 800 ml. del buffer A, llevar a un volumen aproximado de 7000 ml. y ajustar el pH a 6.0 con HCl y completar un volumen de 8000 ml. con agua desionizada.

Procedimiento: Se pesaron 30g de harina de capulín desengrasada y se homogenizaron con agitación constante durante 1½ horas, junto con 4 g. de polyclar, 8 g. de arena limpia y 100 ml. del buffer A (ajustar el pH de este homogeneizado a pH 6.0, si es necesario)

Se filtró el homogeneizado a través de tela de algodón realizando enjuagues con el mismo buffer, sin rebasar un volumen de aproximadamente 160 ml. de filtrado.

Inmediatamente después, este filtrado se centrifugó a 4°C a 17,600g /25 minutos. Se decantó el sobrenadante de los tubos de centrifugación, eliminando los sedimentos, se volvieron a juntar los sobrenadantes y se centrifugaron por segunda vez; bajo las mismas condiciones, pero ahora solo durante 15 minutos.

Se volvieron a decantar y unir los sobrenadantes para dializarlos en refrigeración, durante toda la noche, dividiendo el volumen total en 2 porciones iguales, sometiendo cada una a dializado contra 2 litros del buffer B. Finalmente la solución enzimática dializada, que en total hizo un volumen de 155 ml., fue liofilizada a -50 °C por fracciones de 40 ml.; teniendo la precaución de poner dos de los matraces de liofilización, a peso constante, para después agregar a cada uno de ellos un volumen exacto de dializado, para que una vez obtenido el polvo de liofilización, se pudiera tener el residuo sólido, es decir, el contenido de sólidos totales.

Se hicieron determinaciones de actividad, tanto a la harina desengrasada, como a el filtrado y al dializado; con el fin de tener un seguimiento de la actividad de la β -Glucosidasa presente.

También se les realizó determinaciones de proteína, para poder calcular la actividad específica de cada muestra.

Las determinaciones de proteína, se llevaron a cabo por el método de Lowry modificado(ver pág. 49), para lo cual fue necesario preparar 2 soluciones de extracción, de las proteínas de la harina desengrasada (de las

cuales se tomó el ml. necesario para el método Lowry); una de caracter ácido y otra de carcter básico, ya que no se cuenta con información de con cual de las 2 soluciones se extraen la mayoría de las proteínas de la almendra de capulín. Las soluciones de extracción se prepararon como se indica en la figura 10.

Y para el caso del filtrado y dializado : Se tomaron 400 µl. de cada uno, se aforaron a 250 ml. con agua desionizada y de cada matraz se tomó 1 ml. para la determinación de proteína por Lowry.

en cuanto a las determinaciones de actividad, éstas se hicieron de la misma manera que para la β -Glucosidasa endógena, utilizando el mismo tiempo de reacción de 45 minutos; y para sustituir a la solución de β -Glucosidasa endógena, en la determinación, se hicieron las siguientes soluciones:

En el caso de la harina de capulín desengrasada, se utilizaron 0.34 mg. disueltos en 1 ml. de buffer citrato-fosfatos pH 5.0 $\pm$ 0.1, por tubo de reacción, teniendo 2 tubos de tiempo cero de reacción, es decir, 2 blancos. Y en el caso de el filtrado y dializado: Se tomaron 100 µl. de cada uno, se aforaron a 50 ml. con buffer de citrato-fosfatos pH 5.0 $\pm$ 0.1, y de cada matraz se tomó 1 ml. directamente para el sistema de 6 ml., en total, para la determinación de actividad.

La descripción del proceso anterior, se ilustra en la figura 11.

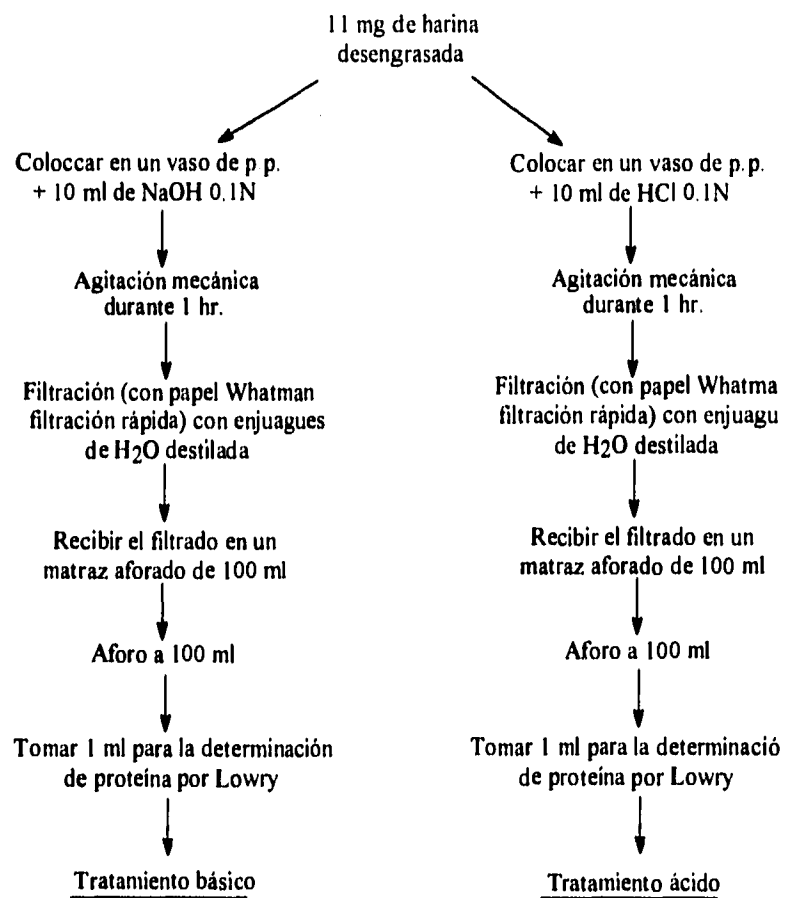


FIGURA 10 Diagrama que muestra la extracción de proteínas por medio de dos diferentes tratamientos

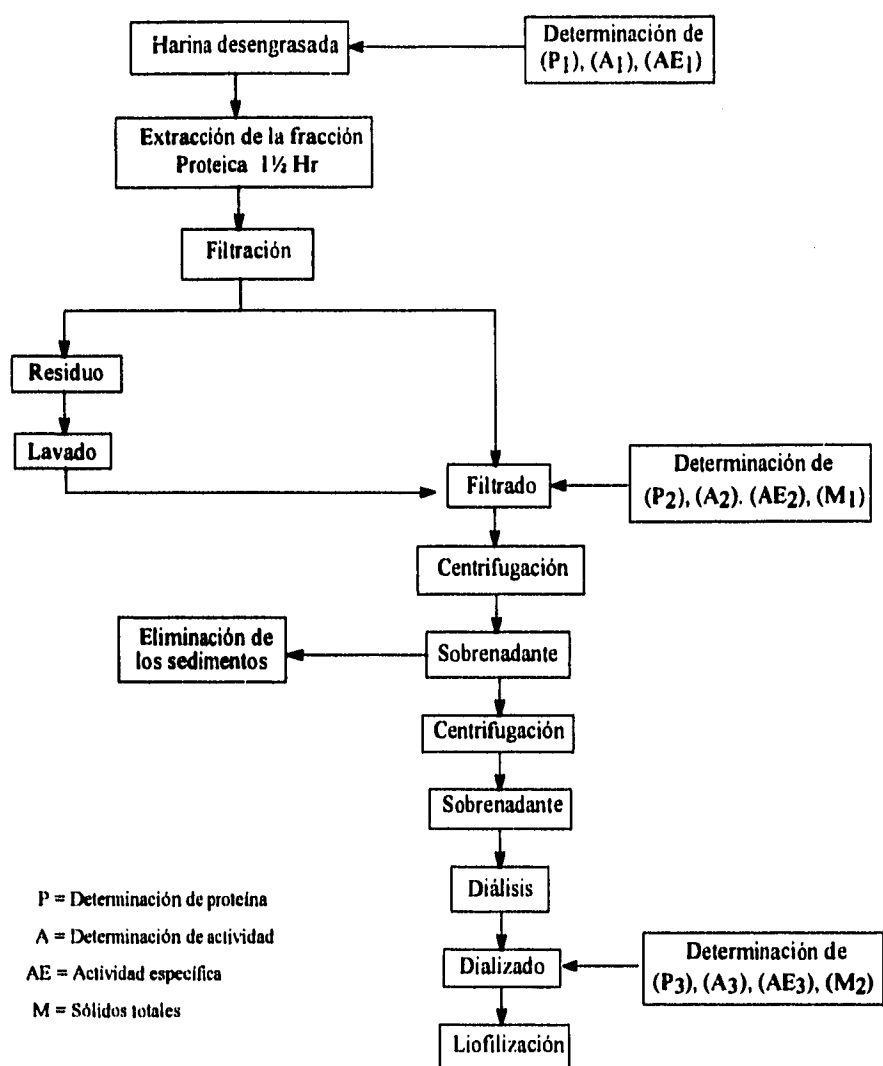


FIGURA 11 Diagrama de flujo para la obtención de un extracto semipurificado con actividad de β -Glucosidasa.

**Comparación preliminar de la enzima comercial con el liofilizado
obtenido, que la contiene.**

Se llevó a cabo la determinación de glucósidos cianogénicos, utilizando la metodología ya decrita (pág 38), en muestras en que el glucósido cianogénico no fuera la amigdalina, como es el caso del frijol de lima (*Phaseolus lunatus*); para lo cual se utilizó una variedad silvestre (frijol del monte) y una cultivada (clave # INIA-CIAT # 524B proporcionado por la Universidad Autónoma de Chapingo) . Para llevar a cabo la comparación preliminar, se realizaron duplicados como mínimo, en una prueba, utilizando la solución de β -Glucosidasa comercial y en otra sustituyendo la anterior solución por la solución del liofilizado obtenido en la misma concentración que la β -Glucosidasa comercial (esta solución sera ahora la fuente de enzima). Lo anterior se llevó a cabo con cada una de las harinas de frijol de lima.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En seguida son presentados los resultados obtenidos de la realización experimental, descrita en el anterior capítulo; y su respectivo análisis o discusión.

Los resultados en general y los presentados en las tablas, corresponden a datos promedio, ya que todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado, como mínimo.

Para el análisis estadístico de los datos, se hicieron las pruebas convenientes con 95% de confianza ($p = 0.05$) con ayuda del programa de cómputo "Statgraphics" versión 5.0.

Solo se presenta la discusión de estos análisis, en los casos que se juzgó de importancia.

Porcentajes

Las semillas de capulín resultaron tener el siguiente porcentaje en cuanto a composición de cáscara y almendra: Cáscara=67.83 %, Almendra=32.17 %.

Como se aprecia, solo una tercera parte es lo que compone a la almendra que es la que finalmente se utiliza como fuente para la obtención del extracto enzimático en el presente trabajo.

La tabla 3 reporta los resultados del análisis bromatológico.

Tabla 3. Análisis bromatológico de la almendra de semilla de capulín.

Determinación	%
Humedad	3.64
Cenizas	2.57
Grasa	47.50
Proteína (Nx 6.25)	34.00
Fibra	3.06
Carbohidratos (por diferencia)	9.23

De los valores anteriores se pudo tomar inmediatamente la decisión de desengrasar la muestra, puesto que como se aprecia, esta porción es la de mayor porcentaje en la composición de la almendra de capulín y es

conveniente eliminarla pues podría interferir en el proceso de purificación de la enzima.

De estos valores se pudo tener también una visión en cuanto a la factibilidad de monitorear la actividad enzimática por medio de la determinación de glucosa, ya que la cantidad de carbohidratos, solo representa alrededor del 9%. No obstante, se determinó el contenido de glucosa libre, que aparentemente no debe de causar problemas ya que su nivel es bajo.

Contenido potencial de β -Glucosidasa

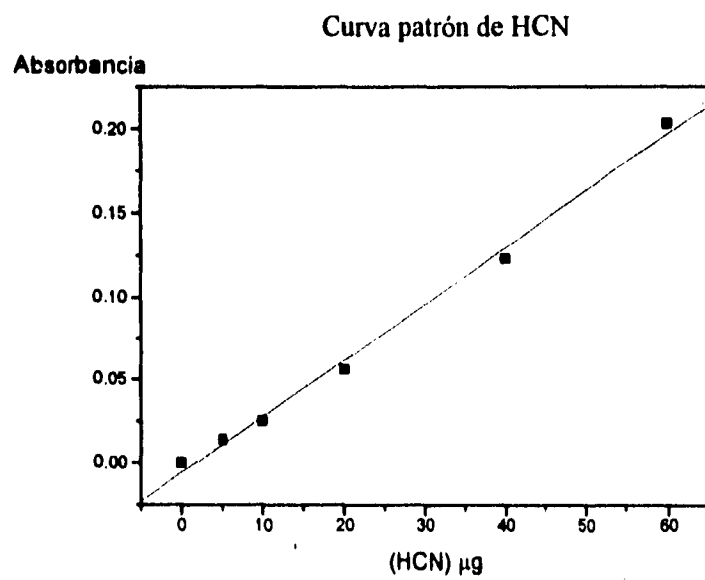
Como se mencionó anteriormente, la determinación del contenido potencial de β -Glucosidasa, en la almendra de la semilla de capulín, se llevó a cabo por medio de la determinación de glucósidos cianogénicos; enseguida se presenta la curva estándar de ácido cianhídrico, en cuya elaboración se fijó el rango de concentración de la cantidad por detectar (5-60 μ g de HCN). La tabla 4 muestra los datos finales de esta curva estándar, y la figura 13 corresponde a la gráfica de absorbancia contra concentración de HCN en μ g.

En cuanto a los resultados del contenido potencial de β -Glucosidasa en la almendra de semilla de capulín; el contenido promedio de glucósidos cianogénicos, en la determinación con adición de enzima fue de 495.49 ± 14.64 mgHCN/ 100 g de muestra y el contenido promedio de glucósidos cianogénicos sin adición de enzima fue de 486.82 ± 126.49 mg HCN/ 100 g de muestra.

Tal como era la expectativa, al analizar los datos anteriores estadísticamente (con la prueba de t de student independiente, con un 95 % de confianza), no se encontró diferencia significativa por lo cual se pudo corroborar que la almendra de la semilla de capulín, es una muy buena fuente para la obtención del extracto con actividad de β -Glucosidasa.

Tabla 4. Curva estándar de ácido cianhídrico.

mg de HCN	Absorbancia
0	0.000
5	0.014
10	0.025
20	0.056
40	0.123
60	0.203



Inactivación de la enzima endógena

Como se sabe que prácticamente cualquier muestra vegetal, tiene glucosa libre, fue necesaria su cuantificación; teniendo como primer objetivo, tomar ya la decisión, de que cuantificar la aparición de producto (glucosa) será, para el presente trabajo, el método mas conveniente. Para dicha cuantificación, se inactivó la β -Glucosidasa endógena, como se describió ya en la parte de desarrollo (capítulo II página 32).

La tabla 5 muestra los datos finales de la curva estándar de glucosa, donde se obtuvo un coeficiente de correlación lineal, bastante aceptable ($r=0.9967$) y el rango de detección de esta curva es de 0-250 μ g. La gráfica correspondiente se presenta en la figura 14.

Los resultados de la determinación de glucosa libre en la almendra de capulín (desengrasada), son presentados en la tabla 6; en la que como se puede observar, el contenido de glucosa libre en la almendra de capulín, no es realmente significativo, ya que no llega a representar ni el 2 % de la composición total de esta almendra; y precisamente este fue uno de los resultados que nos alentó a tener un seguimiento de la actividad enzimática, por medio de la determinación de glucosa (método por aparición de producto)que se presenta consecuentemente con la hidrólisis de el glucósido cianogénico. Ya que al no representar una gran cantidad, se sabe que no interferirá en la cuantificación de glucosa liberada al llevar a cabo la hidrólisis de la amigdalina, ya sea con la β -Glucosidasa comercial o con el preparado semipurificado de capulín.

Tabla 5. Curva estándar de glucosa.

µg de glucosa	Absorbancia
0.00	0.000
25	0.129
50	0.257
75	0.414
100	0.520
125	0.641
150	0.766
175	0.861
200	0.987
225	1.056
250	1.137

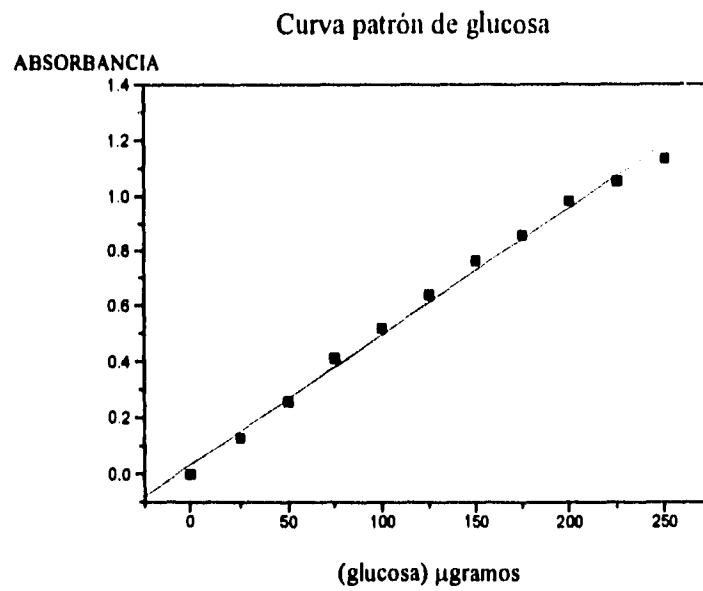


Tabla 6. Determinación de glucosa libre en las almendras de capulín.

Almendra de capulín	Glucosa libre mg/g M	Glucosa libre mg/100g M	% Glucosa libre
	17.25±1.84	1725±184	1.7

M = muestra.

Curva de actividad de la β -Glucosidasa

Fue necesario el desarrollo de un micrométodo para la determinación de actividad de la β -Glucosidasa, y se desarrolló de la siguiente manera:

Se pensó en condiciones adecuadas, de acuerdo a la bibliografía y experiencia, del sistema a desarrollar; como lo es:

- Un volumen adecuado que fue de 6 ml. en total, contando ya con 1 ml. que se agrega, de ácido acético al 18%, para detener la reacción, pues se sabe que las proteínas se desnaturalizan a pH bajo, y además pensando en que en la determinación de glucosa, se utiliza ácido acético como reactivo (el ác. acético es parte de la composición del reactivo de o-toluidina o “ de coloración “ de Merck), por lo que es un punto a favor para que no haya interferencias.

- Llevar a cabo la reacción a una temperatura de 37 °C.

- pH= 5.0 $\pm$ 0.1, con buffer de citrato-fosfatos.

- Adición de NO_3^- , agregado como nitrato de sodio (NaNO_3), que actúa como activador enzimático.

- Relación enzima:sustrato, de 1:4 (en base a peso neto)

Teniendo un control sobre estas condiciones, se procedió a la experimentación; para finalmente, lograr obtener el tiempo de reacción óptimo, es decir, el tiempo al que se presenta la mayor actividad de la enzima.

Conociendo el rango de detección de la curva estándar de glucosa (25a250 μg), se adicionó una concentración tal de amigdalina, que al reaccionar en el sistema, la cantidad de glucosa liberada fuera tal, que aún

llevándolo a cabo la reacción al 100 %, se pudiese detectar aproximadamente a la mitad de la curva estándar, cuando se tomasen 0.5 ml. del sistema para realizar la cuantificación de glucosa. Entonces se partió de una concentración de amigdalina, en el sistema, de 3.05 mg/ 4ml. de buffer; y , de esta forma, si la reacción se llevara a cabo en un 100 %, se tendrían máximo 200 µg de glucosa en 0.5 ml:

$$P.M \text{ amigdalina}=457.4$$

$$3.05 \text{ mg amigdalina} \times (360 \text{ mg glucosa}/457.4 \text{ mg amigdalina})=2.4 \text{ mg glucosa}/6 \text{ ml.}$$

$$\text{Es decir, } 0.2 \text{ mg de glucosa}/0.5 \text{ ml.}=200 \text{ µg de glucosa}/0.5 \text{ ml.}$$

Para determinar el tiempo de reacción, se realizaron determinaciones a diferentes tiempos, desde los 10 hasta los 90 minutos, y después de determinarles glucosa, por el método de la o-toluidina, se obtuvieron los resultados reportados en la tabla 7, y las gráficas de las figuras 15 y 16.

En la tabla 7 se aprecia que el porcentaje de hidrólisis de la amigdalina, va en aumento conforme transcurre el tiempo, y ello es lógico, puesto que se le esta dando a la enzima, mas tiempo de actuar; pero no sucede lo mismo con los valores de actividad (U) y actividad específica, que tanto en la figura 15 como en la número 16, se aprecia una clara tendencia de éstos, a aumentar, hasta los 45 minutos en que el valor descende, es decir, la(s) actividad(es) alcanza un máximo, y esto es finalmente lo que nos interesa para poder establecer el tiempo de reacción en lo sucesivo; que con fundamento en los resultados, será de 45 minutos.

Tabla 7 Determinación del tiempo óptimo de reacción de la enzima β Glucosidasa (comercial)

tiempo de reacción (minutos)	Absorbancia	[glucosa] μ g (en el sist.de6ml.	μ M Glucosa	% hidrólisis	Actividad ^{&=} U(μ M/min)	Actividad especifica U/mgprot*
10	0.124	225.77	1.254	9.41	0.125	5.95
15	0.181	373.61	2.076	15.57	0.138	6.57
30	0.344	796.32	4.424	33.18	0.147	7.00
45	0.553	1338.48	7.44	55.77	0.165	7.86
60	0.676	1657.51	9.21	69.06	0.154	7.33
75	0.688	1688.64	9.38	70.36	0.125	5.95
90	0.751	1852.08	10.29	77.17	0.114	5.43

* Al referimos a los mg de proteína, estamos hablando de la cantidad de β -Glucosidasa, adicionada al sistema, que fueron 0.021 miligramos.

& La actividad esta expresada como μ M de glucosa producida /minuto.

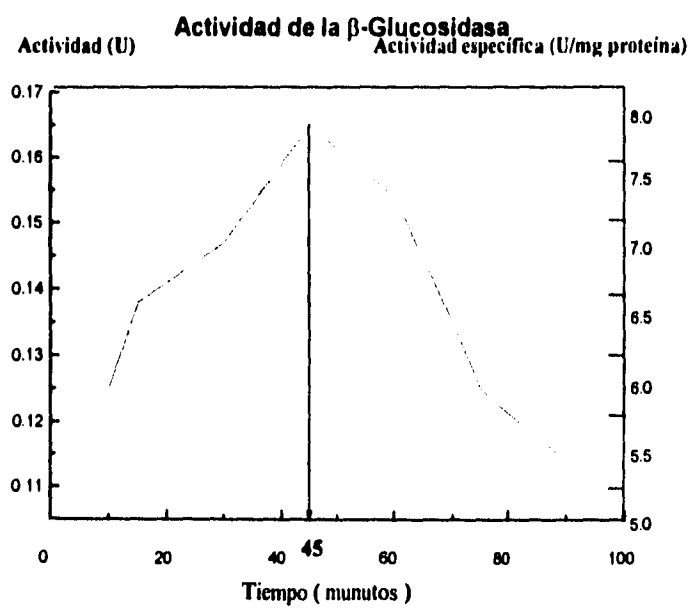


Figura 15 Gráfica de la β -Glucosidasa comercial. Actividad v.s tiempo

Determinación de proteína
(por medio del método Lowry modificado)

Después de haber extraído las proteínas de la harina desengrasada, tanto en medio ácido (HCl), como en medio básico (NaOH), se obtuvieron los datos de la tabla 8

Tabla 8. Extracción de proteínas

	Solución de extracción ácida	Solución de extracción básica
Harina de almendra de capulín desengrasada	45.7 % de proteína	61 % de proteína

El llevar a cabo la extracción de proteínas, en la harina de almendra de capulín desengrasada, por medio de 2 soluciones, una de carácter ácido y otra de carácter básico, se tuvo que realizar puesto que no existe mucha información en cuanto a métodos de extracción de las proteínas de la almendra de capulín, y al realizar la extracción, se encontró que se pueden “extraer” mayor cantidad de proteínas utilizando la solución de carácter básico (casi una tercera parte mas), que con la de carácter ácido; lo cual nos sugiere; que existe una fracción importante de proteínas de caracter ácido, que estan tal vez en mayor cantidad que las de carácter básico. El valor de 61 %, fue el que se consideró como válido en cuanto a la cantidad de proteína que posee la harina de capulín desengrasada, para realizar cálculos posteriores.

La tabla 9, muestra los datos de la curva estándar de albúmina bovina, en la que el rango de detección va de 36-324 μg , y la figura 16 corresponde a la gráfica de esta misma curva estándar.

Tabla 9. Curva estándar de proteína.

μg de proteína	absorbancia
0	0.000
36	0.205
72	0.393
108	0.550
144	0.691
180	0.834
216	0.972
252	1.131
288	1.256
324	1.367

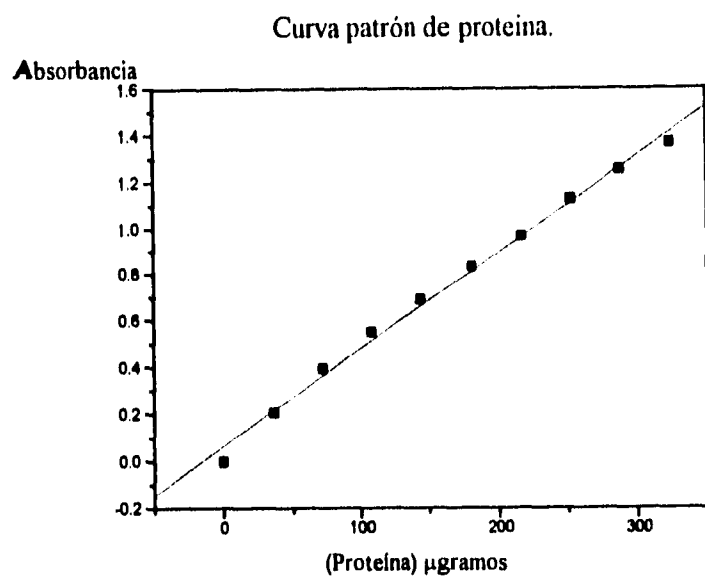


Figura 16 Curva patrón de proteína

Actividad

Tanto de la enzima β -Glucosidasa endógena (almendras integras), como de la harina de almendra de capulín desengrasada.

La realización de esta parte experimental dió como resultados los datos presentados en la tabla 10

Tabla 10. Actividad

	Actividad =U (μ M/min.)	Actividad específica = U/mg proteína.
Almendra de capulín íntegra (ACI)	0.281	0.844
Harina de almendra de capulín desengrasada (HACD)	0.517	0.859

Recordar que para el caso de las almendras de capulín íntegras, para el cálculo de actividad específica, se consideró el valor promedio de 34 % de proteína (dato obtenido por Kjeldhal); mientras que para HACD, se consideró el valor promedio de 61 % de proteína (dato obtenido por Lowry).

Vale la pena mencionar que la determinación de proteína para ACI se hizo también por el método Lowry, pero el valor resultó muy bajo (16 %), por lo que no se pudo considerar como aceptable; esto fue debido seguramente a interferencias como el bien sabido efecto quelante de los fitatos y otros

Actividad

Tanto de la enzima β -Glucosidasa endógena (almendras integras), como de la harina de almendra de capulín desengrasada.

La realización de esta parte experimental dió como resultados los datos presentados en la tabla 10

Tabla 10. Actividad

	Actividad =U (μ M/min.)	Actividad específica = U/mg proteína.
Almendra de capulín íntegra (ACI)	0.281	0.844
Harina de almendra de capulín desengrasada (HACD)	0.517	0.859

Recordar que para el caso de las almendras de capulín integras, para el cálculo de actividad específica, se consideró el valor promedio de 34 % de proteína (dato obtenido por Kjeldhal); mientras que para HACD, se consideró el valor promedio de 61 % de proteína (dato obtenido por Lowry).

Vale la pena mencionar que la determinación de proteína para ACI se hizo también por el método Lowry, pero el valor resultó muy bajo (16 %), por lo que no se pudo considerar como aceptable; esto fue debido seguramente a interferencias como el bien sabido efecto quelante de los fitatos y otros

compuestos polifenólicos hacia el cobre (que se utiliza en la determinación de proteína por Lowry), por manejar la almendra de semilla de capulín integra, (con grasa y sin pulverizar), y consultando en la bibliografía (18), se pudo fundamentar y apoyar tal consideración, ya que se reporta que el contenido de proteína para este tipo de especies vegetales, es de alrededor del 30 %, por lo tanto, se tomó como válido el valor obtenido por Kjeldhal del contenido de proteína en la ACI.

En cuanto a el análisis de los datos que se reportan en la tabla 10, esto es lo que llamariamos la primera prueba o monitoreo de nuestro proceso de purificación ya que al obtener la HACD a partir de las almendras de semilla de capulín integras (ACI), la actividad específica de ACI debe mantenerse, y esto fue precisamente lo que sucedió; se mantuvo la actividad específica de ACI después del desengrasado (no hay diferencia significativa según la prueba de t de student independiente, con un 95 % de confianza) o incluso, pudo haber aumentado un poco pero no lo contrario puesto que si hubiese sucedido algo así, hubiese sido indicio de que al llevarse a cabo el proceso de desengrasado, no se tuvo el cuidado suficiente como para no dañar a la enzima.

En cuanto a la actividad, expresada como micromoles de glucosa producida por minuto por miligramo de muestra, se observa un aumento alrededor del doble, del valor de HACD con respecto al de ACI; esto es bastante coherente puesto que la actividad por miligramo de muestra es mayor en HACD debido a que ya se eliminó una fracción, muy importante, por el alto porcentaje que representa, que es la fracción lipídica, es decir, que 1 mg de HACD esta mas concentrado, por decirlo de alguna manera, que 1 mg de ACI.

Obtención de un extracto semipurificado con actividad de β -Glucosidasa.

En el diagrama para la obtención de este extracto, (figura 11), se puede ver que; que se obtiene después de la primera extracción de proteínas, una fracción a la que se le denominó fracción proteica I (FPI), y que es la que se obtiene durante el proceso, después de haber llevado a cabo la filtración. Se obtiene también otra fracción a la que se le denominó fracción proteica II (FPII). A cada una de las anteriores fracciones se les realizaron una serie de determinaciones, con el fin de tener un seguimiento del avance en el proceso de purificación; cuyos valores se conjuntaron en la tabla 11; y realizando el balance de materia de ambas fracciones, se obtuvieron los rendimientos (en base seca), que se presentan en la misma tabla.

Tabla 11. Seguimiento del avance en el proceso de purificación.

	Proteína %	Actividad U/ml	Actividad U/mg.	Actividad específica U/mgprot	Peso (gramos)	Rendimiento %
HACD	61	-	0.517	0.859	30	100
FPI	67.10	100	0.79	1.18	20.32	67.73
FPII	72.53	98	1.28	1.77	11.935	39.78

Este cuadro, que es la tabla número 11, representa, en resumen el avance, durante el proceso que se llevó a cabo para poder obtener el extracto

semipurificado; y en el se puede ver que el rendimiento va disminuyendo, conforme se avanza en el proceso. Esto es lógico porque se eliminan diferentes sólidos en cada proceso llevado a cabo. La filtración representó el primer retén de sólidos y la diálisis el tercero (el segundo fue la centrifugación) porque se eliminan compuestos de bajo peso molecular, entre los cuales se encuentran algunas proteínas o polipéptidos de peso molecular menor a 12,000 (especificación de la membrana). Precisamente debido a esta eliminación de compuestos que no nos interesan, es que aumenta el porcentaje de la proteína de interés, porque esta fracción se va purificando mas. La determinación de proteína se realiza con al finalidad de poder cuantificar la actividad de β Glucosidasa, en términos de actividad específica.

En cuanto a los resultados de actividad específica, que como mencionamos en el primer capítulo, es uno de los criterios de avance en el proceso de purificación enzimática, se puede observar que con cada una de las diferentes fracciones proteicas (FPI y FPII), va aumentando el valor. La FPI aumento su valor en casi 41 % con respecto a la fracción anterior, que es de la que se partió (HACD), y la FPII aumentó en aproximadamente 47 % su valor con respecto a la anterior fracción (FPI). Es decir que, comparando la FPII con HACD, se logró aumentar la actividad específica en poco mas del doble. (mas del 100 %). Este mismo análisis se aplica también para el caso de los valores de actividad obtenida por miligramo de muestra.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**Comparación de la enzima comercial con el liofilizado obtenido
que la contiene.**

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la determinación de glucósidos cianogénicos en las 2 harinas elegidas de 2 diferentes frijoles.

Tabla 12. Determinación de glucósidos cianogénicos.

Muestra	mg HCN/100g mtra. determinación con enzima comercial	mg HCN/100g mtra determinación con enzima obtenida
Frijol del monte (no cultivado)	199±1	200±1
Phaseolus lunatus var. Silvester Baudet (cultivado INIA-CIAT 524 B)	43.71±0.20	34.82±0.12

Tal vez sea necesario recordar que la determinación de glucósidos cianogénicos, sustituyendo a la enzima comercial por el liofilizado obtenido que la contiene, se realizó llevando a cabo dicha sustitución en la misma concentración, ya que se trata de una comparación preliminar solamente. Es

decir, que se deberan hacer estudios mas profundos en cuanto a esto para poder saber la concentración exacta de liofilizado que puede sustituir satisfactoriamente a la enzima comercial. Y por supuesto sobre una variedad tanto en especie como en cantidad, también satisfactoria de muestras.

En la tabla 12 se observa que la concentración en mg de HCN, en el caso del frijol del monte, que es una especie no cultivada, resultó ser la misma en la determinación con la enzima comercial que en la determinación sustituyendo a la enzima comercial (no existe diferencia significativa, según la prueba de t de student independiente con un 95 % de confianza). Esto se debe muy probablemente a que esta muestra tenga tan alto contenido de glucósidos cianogénicos, que no se note la diferencia entre una determinación y otra.

No sucedió lo mismo en el caso del *Phaseolus lunatus* cultivado, en el que si hubo diferencias en la determinación de glucósidos cianogénicos con enzima comercial y la determinación sustituyéndola. Esta diferencia de valores de la que se habla, es bastante lógica puesto que al dar un menor valor en la determinación con sustitución, nos indica que es necesario purificar mas la enzima, para que pueda alcanzar la misma actividad enzimática que la β Glucosidasa comercial (a esa misma concentración) o bien que necesita aumentarse la concentración del liofilizado, que contiene a la enzima β Glucosidasa, en la solución enzimática que se prepara en la metodología de la determinación de glucósidos cianogénicos, para poder dar así los mismos resultados que con el uso de la enzima comercial.

CONCLUSIONES

El monitoreo de la actividad de la enzima β -Glucosidasa, obtenida de semillas de almendras de capulín, por medio de la determinación de glucosa, es bastante factible de llevarse a cabo puesto que al contener la almendra un muy bajo porcentaje de este carbohidrato, no causa interferencias en la determinación.

Fue necesario desarrollar el método para obtener la curva de actividad de la β -Glucosidasa, ya que no se contaba con antecedentes, y esto se realizó en base a investigaciones bibliográficas. Uno de los parámetros a los que se llegó y que destaca es el de tiempo óptimo de reacción de la enzima, es decir, el tiempo al que presentó la mayor actividad, que fue de 45 minutos. Tiempo que se tomó precisamente para trabajar en lo sucesivo.

Las almendras de semillas de capulín son una muy buena fuente, para la obtención de la enzima β -Glucosidasa, puesto que demostraron poseer un alto contenido potencial de actividad β -glucosídica, además esta fuente es de gran disponibilidad, sobre todo en nuestro país, en el que prácticamente no se obtiene provecho alguno de ella.

Se logró el objetivo de la obtención de un extracto con actividad de β -Glucosidasa, con un rendimiento alrededor del 40 %, y con una actividad aumentada en poco mas del doble con respecto a la harina desengrasada de la que se partió.

En cuanto a la comparación de la enzima comercial con el liofilizado, obtenido, no se puede aún concretar en cuanto a la concentración que podría

sustituir a la enzima comercial, ya que hacen falta estudios mas profundos, sin embargo, si se puede decir que el liofilizado obtenido presenta una buena actividad hasta el punto en el que llegó a purificarse. Por ello esto alienta a continuar con el proceso de purificación.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Kuroki, G.W. Purification and characterization of cyanogen specific Beta-Glucosidases from mature *Prunus serotina* seeds; Diss. Abstr. Int. B 1986, 47 (3), 1038 (1985).
- 2) Conn, E.E. Cyanogenic Glycosides; J. Agr. Food Chem. 17 (3), 519-526 (1969).
- 3) Liener, I.E." Toxic constituents of Plant foodstuffs" 2th. Edition, Academic Press. pp. 143-157 N.Y (1980).
- 4) Li, C. P., Swain, E. and Poulton, J.E.. *Prunus serotina* Amigdalín hidrolase and Prunasin hidrolase. Plant Physiol. 100 (1), 282-290 (1992).
- 5) Winkler, W.O. Report on hydrocyanic glucosides. J.Assoc. Off. Chem. 34 (3), 541-547 (1951).
- 6) Eyjolfsson, R. Recent advances in chemistry of cyanogenic glucosides. Fortsch. Chem. Organ. Naturist. 28, 74-108 (1970).
- 7) Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (eds.) Methods in enzymology I, 234-240, Academic press, N.Y (1955).
- 8) Lucas, B. and Sotelo, A.. A simplified test for the quantitations of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seeds. Nutr. Rept. Int. 29 (3), 711-719 (1984).
- 9) Saha, B. C., Freer, S. N. and Bothast, R. J. Production, purification and properties of a thermostable β -Glucosidase from a color variant strain of

- Aureobasidium pullulans*. Appl.Env.Microbiol. 60 (10), 3774-3780 (1994).
- 10) Martino, A., Pifferi, P. G. and Spagna, G. Production of β -Glucosidase by *Aspergillus niger* using carbon sources derived from agricultural wastes. J. Chem. Fech. Biotechnol. Vol. 60, 247-252 (1994).
 - 11) Harris, J.R., Merson, G.M.J., Hardy, M.J. and Curtis, D.J. Determination of cyanide in animal feeding stuffs Analyst. 105, 974-980 (1980).
 - 12) López, M.A., Quintero, R.R., Tecnología enzimática, aplicaciones en alimentos y medicina; UNAM, pp. 9-17, 61-78 y 117-126 México, D.F (1987).
 - 13) Whitaker, J.R. Principles of enzymology for the food sciences; Marcel Dekker, Inc. pp. 1-28, 31-119, 287-291 and 319-320 N.Y (1972).
 - 14) Bateman, J.V Nutrición animal (manual de métodos analíticos); Herrero Hnos. pag. 110-112 y 170-172, México, D. F (1970).
 - 15) Herlich, K. (edit.) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 15th edition Vol. I and II. pp. 17-18, 40-62, 69-83 and 1012, published by AOAC, Arlington (1990).
 - 16) Bauer J.D. Análisis clínicos: Métodos e interpretación; Ed. Reverté S.A. 518-519, Barcelona (1986).
 - 17) Hartree, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response; Analytical Biochem. No. 48, pp. 422-427, Cambridge (1972).

- 18) Woot-Tsuen, W.L. Tabla de composición de alimentos para uso en América Latina; Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá; edit. Interamericana (1987).
- 19) Jakoby, W.B (edit.) Methods in enzymology Vol. XXII pp. 19-22, Academic Press N.Y. (1969).
- 20) Mosbach, K. (edit.) Methods in enzymology Vol. XLIV pp. 473, 592, 607, Academic Press N.Y. (1979).
- 21) Valle, V.P. Toxicología de alimentos; 2ª ed. ECO. pp. 1-5, México, D.F (1991).
- 22) Espinosa, D.Mª.A. Desarrollo de un método general para determinar el contenido total de glucosinolatos en crucíferas (tesis licenciatura); UNAM, México, D.F, (1994).
- 23) Hugh, P. et al, Lost crops of the Incas; National academic Press pp. 223-227 Washington D.C. (1989).
- 24) Waln, K.T and Poulton, J.E. Partial purification and characterization of an α -D-mannosidase from mature seeds of *Prunus serotina*; Plant science 53 (1), 1-10 Iowa (1987).
- 25) Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (eds.) Methods in enzymology Vol. XXVIII pp. 720-728, Academic Press N.Y. (1972).
- 26) Tietz, N.W. Química clínica moderna; edit. Interamericana pp. 189-194, (1972).