

22
21



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**OBTENCION DE B-GLUCOSIDASA DE CAPULIN
(*Prunus serotina*) Y SU APLICACION EN LA
DETERMINACION DE GLUCOSIDOS
CIANOGENICOS**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
VIRGINIA LOPEZ CASTILLO**



MEXICO, D. F.

1997.

**TESIS CON
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 DESIGNADO:

PRESIDENTE:

PROF. SOTELO LOPEZ ANGELA

VOCAL:

PROF. VALLE VEGA PEDRO

SECRETARIO:

PROF. LUCAS FLORENTINO BERNARDO

1er. SUPLENTE:

PROF. CORNEJO BARRERA LUCIA

2o. SUPLENTE:

PROF. GIL VIEYRA LETICIA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO 111

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

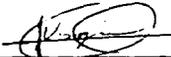
CONJUNTO E

FACULTAD DE QUIMICA, CU.



Asesor del tema

M. en C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO



Sustentante

VIRGINIA LOPEZ CASTILLO

AGRADECIMIENTOS

**Gracias al profesor Bernardo Lucas , mi asesor, por su apoyo,
dedicación y accesibilidad.**

A la profesora Angela Sotelo por haberme recibido en su laboratorio.

Al Colegio de Profesores por su apoyo con la Cátedra de Paracelso.

DEDICATORIAS

**Gracias a Dios
que me dio pies para caminar
que me dio caminos para poder elegir
Y gracias más
por darme la oportunidad de estar.**

**A mis padres por su apoyo, comprensión y amor, pues gracias a ellos
lo he logrado.**

A Marissa, Daniel Alejandro y León, por esos ratos de destedio.

A Martha y Roberto por su apoyo incondicional.

A Natalia por esa facultad de quitar el tiempo siempre.

A Joel por TANTO DE TODO.

A Gladys mi amiga y compañera de siempre.

A Ana, Delia, Martha, Paty y Rocio por esos años “maravillosos”.

DEDICATORIAS

**Gracias a Dios
que me dio pies para caminar
que me dio caminos para poder elegir
Y gracias más
por darme la oportunidad de estar.**

**A mis padres por su apoyo, comprensión y amor, pues gracias a ellos
lo he logrado.**

A Marissa, Daniel Alejandro y León, por esos ratos de destedio.

A Martha y Roberto por su apoyo incondicional.

A Natalia por esa facultad de quitar el tiempo siempre.

A Joel por TANTO DE TODO.

A Gladys mi amiga y compañera de siempre.

A Ana, Delia, Martha, Paty y Rocío por esos años "maravillosos".

A Hugo, Lety, Mónica y Rosario, por las charlas de sobremesa.

CONTENIDO

CAPITULO		PAGINA
1	RESUMEN	1
2	OBJETIVOS	2
3	INTRODUCCION	
	3.1 Familia Rosaceas.	3
	3.1.1 Capulín (<i>Prunus serotina</i>) características generales	4
	3.1.2 Composición química	5
	3.1.3 Condiciones climatológicas y lugares donde se localiza	5
	3.2 Glucósidos cianogénicos	6
	3.2.1 Descripción y estructura	6
	3.2.2 Alimentos que lo contienen	8
	3.2.3 Toxicidad	9
	3.2.4 Catabolismo de los glucósidos cianogénicos.	13
	3.2.5 Prevención del envenenamiento.	14
	3.2.6 Síntesis de los glucósidos cianogénicos.	15
	3.2.7 Hidrólisis enzimática.	17
	3.2.8 Cuantificación.	19
	3.3 Enzimas.	21
	3.3.1 Características generales	21
	3.3.2 β -glucosidasa características generales.	23
	3.3.3 Métodos de purificación	24
	3.3.4 Selección de material, localización de enzimas	26
	3.3.5 Etapas de purificación	28
	3.3.6 Criterios de avance y purificación.	30
	3.3.7 Uso e importancia de la β -glucosidasa	32

4	METODOLOGIA	
	4.1 Material de estudio	34
	4.2 Diagrama del trabajo global	34
	4.3 Métodos utilizados	38
	4.3.1 Determinación de glucosa	38
	4.3.2 Determinación de proteina	40
	4.3.3 Curva de actividad de la β -glucosidasa.	42
	4.3.4 Actividad de la β -glucosidasa en el extracto purificado	44
	4.3.5 Purificación mediante el uso de columna de afinidad	45
	4.3.6 Condiciones óptimas	48
	4.3.7 Determinación de glucosidos cianogénicos	49
	4.3.8 Comparación de la actividad enzimática entre la enzima comercial y la obtenida del presente trabajo	53
5	RESULTADOS Y DISCUSION	
	5.1 Detección del potencial de actividad enzimática de la materia prima	54
	5.2 Curva de actividad de la β -glucosidasa.	54
	5.2.1 Condiciones del sistema	61
	5.3 Determinación de actividad del material inicial	61
	5.4 Purificación por afinidad	62
	5.5 Avance de purificación	70
	5.6 Obtención de las condiciones óptimas de actividad enzimática	71
	5.7 Comparación entre la enzima comercial y el extracto purificado obtenido	80
6	CONCLUSIONES	91
7	BIBLIOGRAFIA	93

CAPITULO I

RESUMEN

El cianuro en forma de glucósidos está ampliamente distribuido en el reino vegetal, y en algunas familias botánicas se puede encontrar en cantidades relativamente grande, el HCN liberado puede presentar problemas de toxicidad aguda o crónica tanto en alimentación humana como animal. La liberación del HCN se realiza mediante una hidrólisis enzimática, donde la presencia de la β -glucosidasa es fundamental; la mayoría de los métodos para la determinación de glucósidos cianogénicos se basa en dicha hidrólisis, utilizando la enzima exógena. De datos bibliográficos se reporta que la planta de "capulín" (*Prunus serotina*) presenta un alto contenido de glucósidos cianogénicos y adecuada actividad β -glucosidasa. Por lo cual el objetivo del trabajo consiste en la obtención de un preparado enzimático estable a partir de la semilla de capulín, que tenga adecuada actividad β -glucosidasa, y que pueda sustituir a la enzima comercial en tal determinación.

En el presente trabajo se obtuvo un preparado enzimático con una actividad específica de 7.65 U/mg proteína, con las siguientes condiciones óptimas de actividad enzimática: 50°C, pH de 5.0, una concentración de enzima de 0.308 mg/ml; adición de NaNO_2 0.08M, un tiempo de reacción de 5 min. que proporciona una buena actividad además de facilitar su manipulación. Presentó un valor de K_m de 192.3 μMol y una V_{max} de 234.42 $\mu\text{Mol/min}$ para el caso de la amígdalina como sustrato. Además se redujo tanto la concentración de enzima como el tiempo de hidrólisis de la metodología previamente establecida en la determinación de glucósidos cianogénicos.

CAPITULO II

OBJETIVOS

- Obtención de un extracto enzimático estable purificado, a partir de la almendra de la semilla de capulín (*Prunus serotina*), que tenga actividad β -glucosídica similar a la enzima comercial y que además pueda sustituir a ésta en la metodología espectrofotométrica para la cuantificación de glucósidos cianogénicos en muestras vegetales.
- Caracterizar los parámetros cinéticos más importantes para el extracto enzimático obtenido, como son: temperatura óptima, pH óptimo, concentración de enzima, tiempo de hidrólisis, K_m y V_{max} .

CAPITULO III

GENERALIDADES

3.1. Familia Rosaceas

Todas las plantas agrupadas en esta familia presentan, como el cerezo, las siguientes características botánicas:

- Una semilla con dos cotiledones
- Una flor que posee:
 - Cinco sépalos.
 - Cinco pétalos libres.
 - Estambres numerosos con antenas introrsas

Basándose en los caracteres del pistilo y del receptáculo, pueden distinguirse:

1. Rosáceas con numerosos carpelos fijos sobre un receptáculo abombado.

Como planta tipo de este grupo debe citarse el fresal. Es una planta herbácea que tiene la propiedad de reproducirse mediante la ayuda de largos tallos reptantes llamados estolones. La zarzamora y la frambuesa pertenecen a este tipo de rosáceas, pero el receptáculo no engruesa, y cada uno de los carpelos se convierte en una pequeña drupa.

2. Rosáceas con un sólo carpelo fijo en el receptáculo hundido y caduco.

Como ejemplos están el ciruelo, el cerezo y el melocotonero, etc.

3. Rosáceas con numerosos carpelos fijos en el fondo de un receptáculo hundido y

persistente Como ejemplos están el rosal salvaje o escaramujo, al cual la familia le debe su nombre. Es un arbustillo enano que florece en verano. Sus ramas poseen aguijones ganchudos, o espinas. Las hojas son pinnaticompuestas, su peciolo está provisto lateralmente de dos largas estipulas.

4. Rosáceas con cinco carpelos soldados en un receptáculo hundido.

Este grupo de rosáceas tiene por tipo el manzano. Es una planta leñosa arborescente.(1)

3.1.1. Capulín (*Prunus serotina*): Características generales

El capulín es un fruto de origen probablemente mexicano, se cree que los españoles introdujeron las semillas de los árboles en el tiempo de la colonia a México y América Central, sin embargo se ha llegado a popularizar tanto que actualmente abunda en la región andina en donde se encuentran los mejores frutos en cuanto a tamaño, color y sabor (2).

El capulín por pertenecer al género de las cerezas negras, se le asemeja mucho en apariencia y sabor. A diferencia que esta fruta se transporta siempre en racimos de tallo corto como el caso de las uvas, son redondos y brillantes de un color marrón, púrpura o negro; su pulpa es verde pálido carmosa y jugosa, es de sabor dulce y algo astringente, contiene una sola semilla de mayor proporción con la pulpa, con una almendra en su interior de sabor amargo, su piel es delgada, pero lo suficientemente firme para poder ser transportada sin que se rompa. Puede ser consumido en fresco, en mermeladas o vinos.

Puesto que el árbol del capulín es muy vigoroso desde el principio puede emerger de su semilla desde una a varias pulgadas del suelo o bien sobre este, los requerimientos de humedad para su germinación y su establecimiento dependen de la especie, así como de la cantidad de luz.

Entre los insectos que dañan al capulín se encuentran el gusano *Mulacosoma americanum* y el *Archips cerasivoranus* que son los más importantes defoliadores, disminuyen el crecimiento y ocasionalmente pueden provocar la muerte.

Algunos hongos que atacan al árbol del capulín están: el hongo negro (*Dibotryon morbosum*) y algunos ascomicetos que atacan a las semillas, a los árboles jóvenes y a los árboles maduros.(1)

3.1.2.Composición química.

Las hojas del fruto contienen aceite esencial, grasa sólida, resina ácida de funciones glucosídicas, amigdalina, alcaloide, ácido tánico, glucosa, principios pécticos, materia colorante, clorofila y sales minerales (3)

3.1.3. Condiciones climáticas y lugares donde se desarrolla

Crece en regiones tropicales, subtropicales, templadas y frías (2,200-3,100 m en el ecuador y temperatura de 10-22°C). Los árboles son extremadamente vigorosos, las flores y frutos comienzan a brotar al tercer año de crecimiento; normalmente alcanzan de 5 a 10 m de altura. No requiere de muchos factores para su crecimiento, ya que puede prosperar en un suelo pobre, un llano de arcilla, y al parecer tiene una preferencia por suelos secos y arenosos. (3). Su cultivo fuera de América es una promesa; ya que puede desarrollarse en muchas regiones, incluyendo algunas donde las cerezas europeas no pueden llegar a desarrollar exitosamente, lo cual puede ser de valor en Asia Menor, el noreste de la India, y otras regiones con clima similar. Aunque no es igual el cultivo de cerezas europeas, producida por generaciones de selección y propagación vegetal, el capulín es de buena calidad con un gran potencial de mejoramiento. En México abunda de Sonora a Chiapas y de Sonora a Veracruz, florece de enero a marzo y fructifica de mayo a junio. El árbol de capulín se utiliza también para producción de madera, ya que es resistente a insectos y hongos, para reforestar pues es de raíces profundas que previenen la erosión.

Se utiliza también como una barrera biológica contra el viento y los pájaros cuando es interplantado en campos de cultivo de alfalfa, maíz y papas.

3.2. Glucósidos cianogénicos

3.2.1. Descripción y estructura general

Los glucosidos cianogenicos son compuestos que liberan HCN, una o más moléculas de azúcar, un aldehído o cetona después de un tratamiento con las enzimas hidrolíticas apropiadas. Estos compuestos tienen una gran distribución entre muchas plantas. Más de mil especies de plantas han sido reportadas como cianogénicas, esto es que liberan HCN cuando el tejido de la planta ha sido aplastado o roto.(4). Los glucósidos cianogénicos puede dividirse en 4 grupos de acuerdo a la estructura química del aglucón:

1. Glucosidos derivados de 2-hidroxi-2-fenilacetoniitrilo, como el caso de la amigdalina.
2. Glucósidos derivados de aglicones alifáticos saturados, como el caso de linamarina.
3. Glucósidos con un aglucón conteniendo un doble enlace en posición α,β al grupo nitrilo, como acacetinalina.
4. Glucósidos con un aglicón acíclico insaturado, como gyno-cardina.

La mayoría de los glucósidos son simples, las excepciones la forman la amigdalina, lucumina y vicianina, los cuales contienen residuos de disacáridos. (5)

La amigdalina, fig. 3.1., es probablemente el más familiar de los glucósidos cianogénicos y se encuentra en muchos miembros de las *Rosáceae*, es un β -glucósido de D-mandelonitrilo o cianhidrina del benzaldehído.

En la hidrólisis de este glucósido se producen dos moles de glucosa y una mol de benzaldehído y una mol de HCN

Wöhler y Liebig reportaron que la hidrólisis alcalina produce anonaco y el glucósido del correspondiente ácido carboxílico, ácido amigdalínico. Estos autores describieron primero la acción del sistema enzimático, llamado emulsina, en almendras, el cual descompone la amigdalina en sus componentes. La emulsina contiene una β -glucosidasa, entre otras enzimas, que es responsable de la hidrólisis del enlace beta.

Varios glucósidos cianogénicos son derivados del hidroxí mandelonitrilo y además producen uno de los hidroxibenzaldehídos en su hidrólisis. El género *sorgum* contiene el glucósido durrina y el aglucon es el p-hidroxí mandelonitrilo

Los otros dos glucósidos ampliamente distribuidos en el reino de las plantas son la linamarina y la lotaustralina, el aglucon es la cianhidrina de la acetona y la cianhidrina metil etil cetona. Un interesante aspecto de estos compuestos es que usualmente coexisten en la misma planta aunque pueden presentar una gran diferencia en sus cantidades. (4)

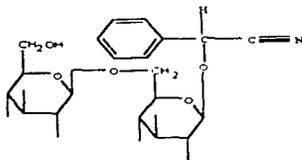


Figura 3.1. Amigdalina (4)

3.3.2. Alimentos que lo contienen

Como ya se dijo el cianuro esta distribuido en cantidad de trazas en el reino de las plantas, en forma de glucósidos. Relativamente altas concentraciones son encontradas en ciertos forrajes, tubérculos y almendras de frutas. Muchos de estos son consumidos por animales y unos pocos tienen importancia práctica en la nutrición humana; como la mandioca (*Manihot utilissima*), el ñame (*Dioscorea bulbifera y alata*), la batata (*Ipomoea batatas*), el sorgo (*Sorghum saccharatum Nees*), el bambú, la remolacha azucarera, la semilla de lino, la judía de Luna (*Phaseolus lunatus*). También las semillas de linón, melocotón, albaricoque, cereza, manzana, pera, ciruela, almendras amargas (*Prunus amygdalus*) y capulín. En Europa solamente tienen importancia las almendras amargas que se usan como condimento. En EU, donde se emplea mucho como alimento la judía, no se permiten variedades cuyo contenido de HCN sea superior a 20 mg/100 g. El contenido de la corteza de la raíz de la cassava amarga es superior a este tope; el de las variedades dulces es menor.(6)

En la siguiente tabla se enlista los glucósidos más comunes en la alimentación humana donde se indica la fuente y los productos de hidrólisis (4)

Tabla 3.1. Algunos glucósidos cianogénicos. (4)

GLUCOSIDO	FUENTE	PRODUCTOS DE HIDROLISIS
Amigdalina	Miembros de la Rosaceae almendras, manzanas, cereza, pera, durazno, ciruela, membrillo, capulín	Gentobiosa + HCN + benzaldehído
Prunasina	Miembros de la Rosaceae cereza laurel, <i>Eucalyptus cladocalyx</i> , <i>Linaria striata</i>	D-glucosa + HCN + benzaldehído
Sambunigrina	<i>Sambucus nigra</i> L., <i>Acacia</i> sp.	D-glucosa + HCN + benzaldehído
Vicianina	<i>Vicia</i> sp.	Vicianosa + HCN - benzaldehído
Durrina	<i>Sorghum</i> sp.	D-glucosa + HCN + p-hidroxibenzaldehído
Taxifilina	<i>Toxicus</i> sp.	D-glucosa + HCN + p-hidroxibenzaldehído
Linamarina	<i>Phaseolus lunatus</i> , <i>Limnium usitatis-simum</i> , <i>A. lanihot</i> sp., <i>Lotus</i> sp. y <i>Dimorphotheca</i> sp.	D-glucosa + HCN + acetona
Lotaustralina	Coexiste con linamarina	D-glucosa + HCN + 2-butanona

3.2.3. Toxicidad de los glucósidos cianogénicos

Probablemente una de las primeras descripciones de envenenamiento humano por cianuro de origen vegetal fue dado por Davidson y Stevenson (1884), esto ocurrió en Mauritius por la ingestión de *Phaseolus lunatus*. Las características clínicas fueron confusión mental, parálisis muscular generalizada, y paro respiratorio, como en un envenenamiento agudo con cianuro inorgánico. El HCN ejerce su acción tóxica bloqueando a la citocromo oxidasa, impidiendo con ello la respiración celular, y la muerte se produce por anoxia. Especialmente sensibles a la interrupción de la respiración interna son el cerebro y el músculo cardíaco (6).

El cianuro ingerido es rápidamente adsorbido por la parte superior del tracto gastrointestinal. Pasa rápidamente a través de la piel, y el gas es rápidamente absorbido por los pulmones. (7)

Además del peligro del envenenamiento agudo hay que considerar el del envenenamiento crónico, que hasta el momento permanece sin explicación. Se desconoce el metabolismo de los glucósidos que contienen HCN en el organismo humano. Se ha demostrado que la ingestión continua de las sustancias que contienen cianuro del *Lathyrus* y de la *Vicia* puede producir trastornos graves. Son trastornos nerviosos los que aparecen como consecuencia de la ingestión crónica de cianuro.

Por administración crónica de amigdalina, y , en menor grado de linamarina, se observan trastornos en el desarrollo de los fetos de hamster sirio. La ingestión en el octavo día de la gestación de 0.55 mmol de amigdalina/kg de peso produjo mal formaciones en el cerebro y defectos en las costillas.

La tabla 3.2 presenta el contenido de HCN liberado de glucósidos cianogénicos en las plantas que son más comúnmente ingeridas por humanos como alimentos, y que puede resultar en un envenenamiento agudo por cianuro. (6)

Tabla 3.2. Contenido de HCN de diferentes plantas (6)

Planta	Contenido de HCN (mg/100 g)
Almendra amarga	250
Mandioca	
- Corteza de la raíz	245
- Tallo	113
- Raíz entera	55
- Sorgo planta entera	250
Bambu	
- Punta de los brotes inmaduros	800
- Tallo inmaduro	300
Judía de Lima	
- Variedad coloreada de Java	312
- Variedad negra de Puerto Rico	300
- Variedad blanca de Burma	210
- Variedad coloreada de Arizona	17
- Variedad blanca americana	10

En algunos casos puede ocurrir envenenamiento con vegetales cocinados, esto sugiere que no todo el HCN ha sido removido, durante el remojo previo al cocimiento de la planta.

La capacidad de producción de HCN por el frijol de lima es de acuerdo a la variedad siendo las cepas americanas las que contienen menor cantidad. La variedad blanca americana produce sólo 10 mg de HCN/100 g de semilla, una variedad blanca burma produce 200 mg y una variedad negra de Puerto Rico produce 300 mg de HCN/100 g, de acuerdo a lo anterior la dosis de HCN letal para humanos adultos es de un rango de 50-250 mg por lo que el consumo de 100 g de las últimas semillas

puede resultar fatal. En algunas zonas donde las legumbres son la base de la dieta, la ingesta diaria puede alcanzar 200-300 g de frijoles. Hoy en día, la importación de frijol de lima es restringida por muchas naciones

La ingestión del glucósido cianogénico no es venenosa, ya que en el tracto digestivo humano no existe ninguna β -glucosidasa, pero algunas bacterias intestinales pueden descomponer el glucosido dejando en libertad el HCN.

En investigaciones con hámster sirio se ha demostrado que en la porción final del intestino la amigdalina se desdobra mucho más rápidamente que la linamarina por acción de las β -glucosidasas bacterianas

Bajo condiciones idénticas, en 40 minutos se libera 4 ó 5 veces más cianhídrico de la amigdalina que de la linamarina. Con ello, el contenido de cianhídrico de la sangre sube rápidamente y en el hámster dorado alcanza un máximo al cabo de 1 hr de administración oral de amigdalina, que se mantiene durante 3 horas. Por el contrario, después de la administración de la linamarina el cianhídrico sanguíneo no alcanza su máximo hasta las 3 horas cayendo después rápidamente

Mientras que la amigdalina no desdoblada se absorbe en muy pequeñas cantidades (menos de 1%), como se ha demostrado en ratas la que procede de la escisión de la prunasina que contiene glucosa, se reabsorbe en un 50%. Como estos glucosidos apenas se escinden en el organismo, aparecen en la orina. En las plantas que contienen estos glucósidos cianogénicos, la β -glucosidasa es extracelular y solamente por destrucción física o química de la pared celular puede llegar a ponerse en contacto con el compuesto. Los métodos usuales de preparación mediante trituración, remojo en agua, cocer en cacharros destapados y tirar el agua, tienden a eliminar el HCN.(7)

3.2.4. Catabolismo de los glucósidos

El organismo dispone de posibilidades de detoxificación. Existe una sulfurtransferasa (rodanasa) que cataliza la reacción del HCN con el tiosulfato, sintetizado en el hígado, con lo que se forma sulfito y tiocianato que es eliminado por la orina. Esta enzima está ampliamente distribuida en los tejidos vivos, alcanzando altas concentraciones en el hígado, riñón, tiroides, y páncreas.

Existe otro mecanismo de detoxificación, mediado también por una transferasa, consiste en la reacción del HCN con el ácido 3-mercaptopurúvico, con lo que se forma tiocianato y ácido purúvico, como se ha demostrado con estudios con animales. También la vitamina B₁₂ (hidroxicobalamina) tiene interés como antídoto, fija el ión cianuro (cianocobalamina), que se libera nuevamente por acción de la luz. La mortalidad de los ratones a causa del HCN puede evitarse con inyecciones de vitamina B₁₂.

Los envenenamientos con HCN se tratan también con tiosulfato sódico muy eficaz e inofensivo, pero cuya acción tarda más en manifestarse. Si la capacidad antitóxica no es suficiente se aplica también cobal histidina de acción más rápida. El HCN tiene una gran afinidad por la metahemoglobina, por lo que también se emplea la inducción de sustancias que induzcan su formación, como por ejemplo, p-dimetil amino fenol, o la inhalación de amilonitrito. El efecto antitóxico se debe a su capacidad para oxidar la hemoglobina, de todas formas hay que tener en cuenta que no se debe transformar en metahemoglobina más que un 10% de la hemoglobina.

3.2.5. Prevención del envenenamiento

Una de las formas más comunes destoxificar los vegetales es mediante la cocción, que destruye a la β -glucosidasa, inhibiendo con esto la hidrólisis enzimática y por ende la liberación del HCN.

La toxicidad de la cassava ha sido estudiada. Como para mucha gente representa una fuente de alimentación se ha desarrollado un importante método de preparación que sirve para remover o hidrolizar la linamarina y la lotaustralina, así como para destruir el β -glucosido que está presente. Como la cassava es rica en almidón, se fragmenta o se ralla y, se remoja en agua, dejandola fermentar por varios días.

Bajo estas condiciones, el cianógeno es extensamente hidrolizado, y éste, junto con sus productos de hidrólisis son eliminados. El tejido ya remojado se seca y se transforma en harina, y dependiendo de la región se consume como pan o como una pasta hervida. La cantidad de HCN liberada de la raíz de la cassava fresca (38 mg/100 g) es reducida a 1.1 mg/100 g en la preparación de la cassava conocida como "gari". Otra preparación conocida como "purupuru" en la cual no se hace un extenso lavado, puede producir 4-6 mg de HCN/100 g de cassava. Algunos nigerianos pueden consumir 750 g de cassava por día, esto corresponde a 8 mg de HCN si el alimento es tomado como "gari". Esta cantidad, sin embargo, puede incrementarse de 32-48 mg de HCN si se consume como "purupuru". Estos valores, considerando el límite inferior de la dosis letal de HCN (35 mg), resultan superiores en el caso del purupuru, de datos experimentales (6).

En la siguiente figura se sintetiza el uso de la cassava:

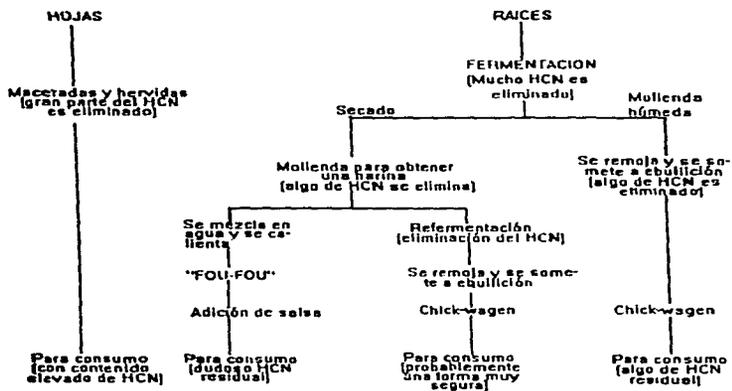


FIG.3. 2 Destoxificación de la cassava (7)

3.2.6 Síntesis de glucósidos cianogénicos

En vista de los problemas asociados con el consumo de plantas cianogénicas por hombres y animales, es de importancia notar el origen biosintético de los glucósidos cianogénicos, como a continuación se describe.

Algunos de los glucósidos ya mencionados son sintetizados a partir de cuatro aminoácidos: valina, isoleucina, fenilalanina y tirosina. Existen dos factores

bioquímicos de interés, el grupo ciano o nitrilo que es derivado a partir del carbono alfa y átomos de nitrógeno provenientes de aminoácidos; y los intermediarios que envuelven estos compuestos que no se encuentran previamente en el metabolismo de los aminoácidos en animales y microorganismos.

A partir de la tirosina se sintetiza la durrina en el sorgo; de la fenilalanina se sintetiza en las hojas de la cereza laurel la prunasina, a partir de la valina se sintetiza la linamarina y por última la isoleucina da origen a la lotaustralina.

Estas relaciones se pueden observar en la figura 3.3(4)

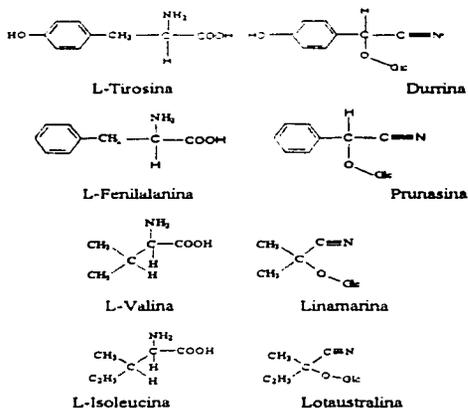


Fig. 3.3 Aminoácidos precursores de glucósidos cianogénicos. (4)

3.2.7. Hidrólisis enzimática

El sistema enzimático que hidroliza los glucosidos cianogénicos se encuentra dentro de la misma planta pero en diferentes células. Cuando el tejido de la planta ha sido dañado, la enzima es liberada y entra en contacto con el glucósido. El sistema enzimático β -glucosídico para el caso de la amigdalina, está comprendido por amigdalinhidrolasa, prunasinhidrolasa y mandelonitriloliasa, que actúan en el mismo orden.

La hidrólisis es fácilmente efectuada, los glucosidos se descomponen lentamente en soluciones acuosas frías y más o menos rápidamente cuando son calentadas. La hidrólisis del enlace glucosídico es también catalizada por ácidos y generalmente es más estable a la acción de agentes básicos.

Una notable excepción es la triglochinina que se descompone en soluciones de hidróxido de bario aun a bajas temperaturas. También, hay evidencias de que la diurrina es inestable en la presencia de resinas de intercambio iónico básicas o en soluciones básicas.

Las hidrólisis mencionadas, tanto la enzimática como la química se muestran en la figura 3.5 (7)

3.2.7. Hidrólisis enzimática

El sistema enzimático que hidroliza los glucósidos cianogénicos se encuentra dentro de la misma planta pero en diferentes células. Cuando el tejido de la planta ha sido dañado, la enzima es liberada y entra en contacto con el glucósido. El sistema enzimático β -glucosídico para el caso de la amígdalina, está comprendido por amigdalinhidrolasa, prunasinhidrolasa y mandelonitriloliasa, que actúan en el mismo orden.

La hidrólisis es fácilmente efectuada, los glucósidos se descomponen lentamente en soluciones acuosas frías y más o menos rápidamente cuando son calentadas. La hidrólisis del enlace glucosídico es también catalizada por ácidos y generalmente es más estable a la acción de agentes básicos.

Una notable excepción es la triglochinina que se descompone en soluciones de hidróxido de bario aun a bajas temperaturas. También, hay evidencias de que la diurrina es inestable en la presencia de resinas de intercambio iónico básicas o en soluciones básicas.

Las hidrólisis mencionadas, tanto la enzimática como la química se muestran en la figura 3.5.(7)

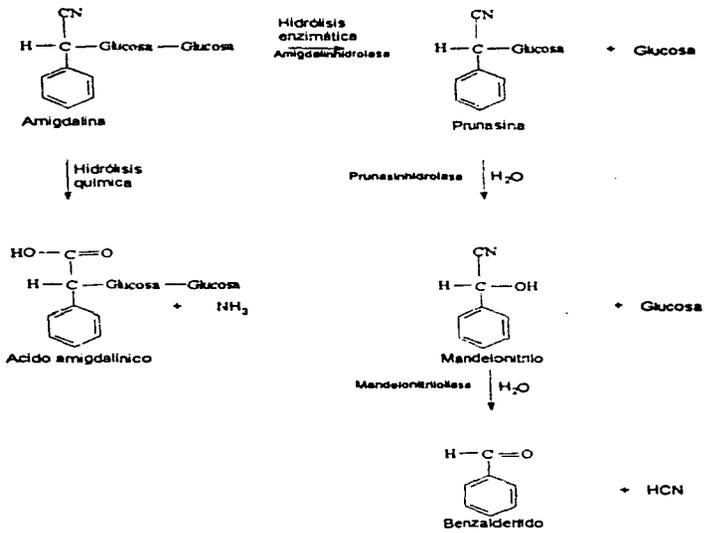


Fig. 3.4 Hidrólisis enzimática y química de la amigdalina. (5)

Para el caso de la amigdalina primero es hidrolizada por la amigdalín hidrolasa a prunasina y glucosa; la prunasin hidrolasa hidroliza a D-mandelonitrilo y glucosa y por último la mandelonitrilolasa la hidroliza a benzaldehído y HCN, como se puede observar en la figura 3.4. (5)

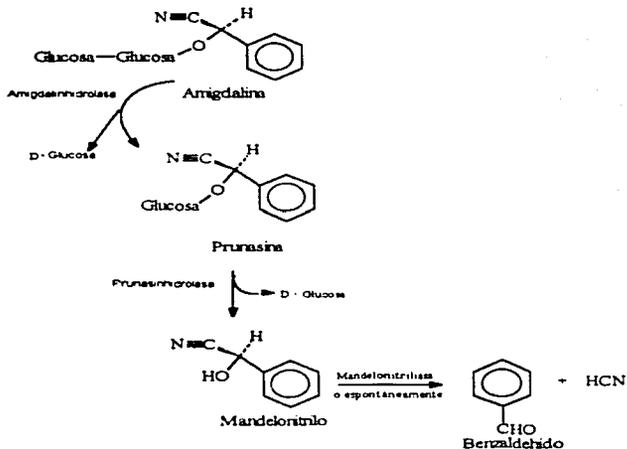


Fig. 3.5 Enzimas que participan en la hidrólisis de la amígdalina.(5)

3.2.8. Cuantificación de glucósidos cianogénicos

Winkler ha clasificado en cuatro grupos a los métodos propuestos para la determinación de glucósidos cianogénicos en materiales biológicos.

1. Métodos autoenzimáticos: en los cuales la liberación del HCN depende de las propias enzimas de la muestra para liberarlo de los respectivos glucósidos.
2. Método de hidrólisis ácida: en donde los glucósidos son extraídos por disolventes y después se libera el HCN por un hidrólisis ácida.

3. Método enzimático adicional: también llamado de HCN total, en los cuales se adiciona una enzima de otra fuente para llegar a la completa liberación del HCN.

4. Método enzimático con adición de un preservativo se hace uso de la adición de un conservador para prolongar el tiempo de autoliberación del HCN.

Un método satisfactorio de extracción, consiste en un aparato de destilación con vapor con HCl al 5% a 100°C por 3 horas, el destilado es colectado en NaOH al 2.5% y el HCN es entonces determinado por titulación con yodo. El punto final de la titulación depende de la detección de un precipitado de yoduro de plata pero el método no se puede aplicar cuando hay bajas concentraciones de HCN.

La prueba de Guinard puede ser usada cuantitativamente para detectar la cianogénesis. Un papel de picrato de sodio es preparado remojando una tira de papel filtro en una solución de ácido picrico al 1%, es secado y se vuelve a remojar en una solución de carbonato al 10% y finalmente se vuelve a secar. El material de prueba es cortado finamente y colocado el tubo de prueba. El papel ya humedecido con el picrato de sodio es insertado sin tocar el material, unas gotas de cloroformo son añadidas, y el tubo se tapa, el papel va a ir cambiando de color naranja a rojo ladrillo. Esta prueba es positiva cuando el material produce aproximadamente 50 µg de HCN/g de muestra (7)

Un método colorimétrico cuantitativo derivado del anterior que puede estimar HCN en un rango de 5-50 µg/g de extracto, hace uso de la detección de la isopurpurina que se forma a partir del ácido picrico con dos moléculas de HCN en medio alcalino. (Fig. 3.6)(8)



Fig. 3.6 Formación de color en la determinación de glucósidos cianogénicos(8)

3.3. Enzimas

3.3.1. Características generales

Las enzimas son proteínas biosintetizadas por las células de los organismos vivos con la función específica de catalizar reacciones químicas, estas incrementan la velocidad a la cual las reacciones se aproximan al equilibrio. La velocidad se define como el cambio en la cantidad (moles, gramo) de materiales iniciales o de productos por unidad de tiempo. Provocan el cambio de velocidad actuando como un catalizador. Un catalizador verdadero incrementa la velocidad de la reacción química pero sin cambiar el proceso, estos catalizadores biológicos pueden unirse temporalmente de forma covalente a la molécula que se está transformando durante los pasos intermedios de la reacción, pero al final la enzima se regenera en su forma original mientras se libera el producto (9). Hay dos características importantes de la catálisis en general y de las enzimas en particular. La primera es que la enzima no se modifica en su actuación, la segunda es que no modifica la constante de equilibrio de la reacción sino que sencillamente incrementa la velocidad a la que la reacción se aproxima al equilibrio. Por tanto, un catalizador es responsable de incrementar la velocidad pero sin variar las propiedades termodinámicas del sistema con el que interacciona. En los sistemas biológicos es necesario el catalizador ya que a la temperatura y pH del cuerpo humano las reacciones no se producirían a suficiente velocidad para permitir una rápida actividad muscular, generación de impulsos nerviosos y todos los demás procesos requeridos para la existencia de la vida. Las enzimas se clasifican de acuerdo a un sistema establecido por la International Union of Biochemistry en 6 clases principales. A cada clase, sub-clase y sub-subclase se le asigna un número de manera que la enzima tiene un número de 4 dígitos así como un nombre. El cuarto dígito identifica al enzima concreto, al nombrar una enzima,

se señalan primero los sustratos, seguidos por el tipo de reacción al que se le añade el sufijo *asa*. A continuación se describen brevemente las 6 clases de enzimas.

1. Oxidorreductasas

Estas enzimas catalizan reacciones de oxidación y reducción: por ejemplo, la alcohol:NAD oxidorreductasa cataliza la oxidación de un alcohol a aldehído. Esta enzima elimina dos electrones en forma de dos hidrógenos del alcohol para producir un aldehído y, en el proceso, los dos electrones que originalmente estaban en el enlace carbono-hidrógeno, del alcohol, se han transferido al NAD^+ , el cual queda reducido.

2. Transferasas

Estas enzimas están implicadas en la transferencia de grupos funcionales entre dadores y aceptores. Las principales porciones transferidas son los grupos amino, acilo, fosfato, glucósido y los grupos monocarbonados.

Las aminotransferasas (transaminasas) transfieren los grupos amino de un aminoácido a un cetoácido aceptor, dando lugar a la formación de un nuevo aminoácido y un nuevo cetoácido.

3. Hidrolasas

Este grupo de enzimas se puede considerar como una clase especial de transferasas en las que el grupo dador se transfiere al agua. La reacción generalizada implica la rotura hidrolítica de enlaces C-O, C-N, O-P y C-S.

Las enzimas proteolíticas constituyen una clase especial de hidrolasas denominadas peptidasas.

4. Liasas

Las liasas son enzimas que añaden o eliminan los elementos del agua, amoníaco o CO_2 .

Las descarboxilasas eliminan los elementos del CO_2 de α y β cetoácidos o aminoácidos.

5. Isomerasas

Este es un grupo muy heterogéneo de enzimas que catalizan isomerizaciones de diferentes tipos. Entre ellas se encuentran interconversiones cis-trans, ceto-enol y aldosa-cetosa. Las isomerasas que catalizan la inversión en carbonos asimétricos son epimerasas o racemasas.

6. Ligasas

Estas enzimas participan en reacciones sintéticas en las que se unen dos moléculas a expensas de un enlace fosfato de alta energía de ATP; el uso de sintetetasas se reserva para este grupo particular de enzimas (9).

3.3.2. β -glucosidasa características generales

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 no precisamente de una sola β -glucosidasa sino de un complejo enzimático compuesto de dos enzimas que son la amigdalina hidrolasa (AH) y prunasina hidrolasa (PH), involucradas en la hidrólisis de la amigdalina, cada una de las cuales al parecer poseen múltiples formas es decir, isoenzimas. Li Chun P., Swain E. y Poulton J. E. reportan cuatro formas de la AH (AH1, AH1', AH11 y AH11') y tres formas de la PH (PH1, PH11_a y PH11_b) que fueron purificadas por cromatografía a partir de homogenizados de capulín maduro (*Prunus serotina*) y como la purificación se llevó a cabo con varios inhibidores de proteasas, ellos sugieren 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 glucopeptidasas (10).

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 de 4.5-5.5, la inactivación de la β -glucosidasa es relativamente rápida a pH superior a 8.2 y menor a 4.0. Su temperatura óptima es de 37-38°C.

En lo que se refiere a actividad, esta es una función del ambiente iónico.

Con algunos cationes el rango de hidrólisis es de aproximadamente el doble, por ejemplo con Na^+ , K^+ , Rb^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} , lo mismo sucede con los aniones I^- , NO_3^- , ClO_4^- , ClO_3^- , (adicionados como sales de amonio o potasio 0.08M) (11)

3.3.3. Métodos de purificación

A continuación se menciona como pueden aprovecharse ciertas propiedades características de las proteínas globulares en disolución para separar mezclas de proteínas basándose en su :

1. Tamaño molecular
2. Solubilidad
3. Carga eléctrica
4. Diferencias en sus características de adsorción
5. Afinidad biológica para otras moléculas

1. Procedimientos de separación basados en el tamaño molecular.

La característica más notable de las proteínas es su gran tamaño, el cual permite el uso de métodos sencillos para la separación de las proteínas de moléculas de

pequeño tamaño, así como los métodos para la resolución de mezclas de proteínas. Se divide en:

- Diálisis y ultrafiltración
- Centrifugación en gradiente de densidad (zonal)
- Cromatografía de exclusión molecular

2. Procedimientos de separación basados en diferencia de solubilidad.

Las proteínas en disolución muestran cambios profundos de su solubilidad, lo cual es función de pH, fuerza iónica, las propiedades dieléctricas del disolvente y la temperatura. Estas variables que son reflejo del hecho de que las proteínas son electrolito de peso molecular muy grande, pueden utilizarse para separar mezclas de proteínas, ya que cada proteína posee una composición en aminoácidos característica, la cual determina su comportamiento como electrolito. Se divide en:

- Precipitación isoelectrica
- Solubilización y precipitación por salado de las proteínas
- Fraccionamiento con disolventes
- Efecto de la temperatura sobre la solubilidad de las proteínas

3. Procedimientos de separación basados en la carga eléctrica

La separación de proteínas sobre la base de su carga eléctrica depende en último término de sus propiedades ácido-básicas, las cuales se hayan determinadas en gran medida, por el número y los tipos de grupos R ionizables de sus cadenas polipeptídicas. Puesto que las proteínas difieren en su composición aminoácida y secuencia, cada proteína posee propiedades -ácidos-básicas características. Se divide en:

- Métodos electroforéticos
- Cromatografía de intercambio iónico

4. Separación de proteínas por adsorción selectiva

Las proteínas pueden ser adsorbidas, y posteriormente eluidas selectivamente, de columnas de materiales relativamente inertes que estén finamente divididos y con un área superficial muy grande en relación con su tamaño de partícula.

5. Separaciones basadas en la especificidad del ligando

Cromatografía de afinidad, este método se basa en una propiedad biológica de algunas proteínas. Su capacidad de unión específica, no covalente con otra molécula llamada ligando. Por ejemplo, algunas enzimas se unen muy fuertemente con sus coenzimas específicas, mediante fuerzas no covalentes. A fin de separar una enzima de esta naturaleza, de otras proteínas mediante la cromatografía de afinidad su coenzima específico se une covalentemente por medio de una reacción química apropiada a un grupo funcional situado sobre la superficie de partículas hidratadas de gran tamaño de una columna de material poroso, por ejemplo, el polisacárido agrosa, el cual de otro modo permitiría que las moléculas proteicas pasen libremente a su través (9).

3.3.4. Selección del material y localización de enzimas en la purificación

Si uno desea estudiar un tipo de enzima particular sin considerar la fuente, debe escoger un material inicial que contenga una gran cantidad de enzima y que pueda ser plenamente extraída. Por ejemplo el rabano picante y el latex del higo contienen una alta concentración de peroxidasa comparado con otros tejidos de plantas. Cerca del 20% de la proteína total de un homogenizado de pulpa es trifosfato deshidrogenasa.

Las enzimas están localizadas en las células de algunas plantas. Las enzimas en frutas frecuentemente están concentradas cerca de la piel y/o cerca de la semilla con bajas concentraciones de enzimas en el resto de los tejidos. Es importante examinar la

concentración de enzimas en cada una de las partes del organismo para usar solamente la fuente mas rica. Dentro de un organo no hay una concentración uniforme de enzimas. En una semilla, una enzima especifica puede estar concentrada en la capa aleurona, en el endospermo o en cualquier otra parte de la semilla. En una hoja, la enzima puede estar en la grana, cloroplastos, mitocondria, etc.

La localización de las enzimas en un tejido puede ser facilmente vista utilizando la técnica llamada histoquímica. Diferentes compuestos -proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos- son selectivamente coloreados con diferentes tintas haciendo más facil su localización en el tejido de estudio (12)

Después de seleccionar la fuente de proteína, será necesario llevarla a la solución purificadora. La mayoría de los casos se trabaja con fuentes naturales, manipuladas o no, aunque en algunos casos estas pueden ser artificiales, por ejemplo una síntesis química realizada fuera de un sistema biológico.

En general nos referimos a las dos opciones del primer caso, sin embargo, es importante considerar el periodo de producción de la proteína, ya que sería inutil tratar de aislarla antes de que se produzca, así mismo, se deben valorar las posibilidades de inducción para contar con mayor cantidad.

La primera alternativa que se nos plantea es la posición de la proteína dentro de la célula o como resultado de la expresión al medio extracelular. En este caso se deben considerar:

- Si es célula vegetal o animal
- Su situación intracelular

El segundo caso nos elimina la participación de la estructura celular, lo que limita extraordinariamente el número de contaminantes de naturaleza proteica que se deben eliminar.

En la mayoría de los casos es necesario llevar a cabo la ruptura de la membrana celular, lo que se realiza de distintas maneras

1. Medios mecánicos: molinos de arena, agitación a alta velocidad con perlas de vidrio y oscilaciones sónicas o ultrasónicas
2. Medios físicos: tratamiento térmico y choque osmótico
3. Medios químicos: solventes orgánicos (acetona, butanol, etc.) y detergentes
4. Medios enzimáticos: hixozima, papaina y la combinación de algunos de ellos.

Se recomienda, además, controlar el pH para evitar la liberación de ácidos fenólicos que son muy agresivos al unirse a las proteínas

La recolección es el proceso de separación de la fracción donde se encuentra la proteína después de la ruptura. Se puede encontrar en la fracción sobrenadante en forma soluble o precipitada (asociada o no a alguna fracción subcelular) por lo que se incluye la centrifugación

3.3.5. Etapas de purificación

De acuerdo con Whitaker (13) después de que la enzima ha sido extraída y centrifugada para eliminar el material suspendido, es necesario ajustar el pH, adicionar sulfato de protamina o estreptomicina para eliminar ácidos nucleicos y un tratamiento térmico. En este punto, el volumen de la solución es grande y la concentración de enzima baja, por lo que se incluye un paso de concentración. Este puede desarrollarse por precipitación fraccional con sulfato de amonio o con solventes orgánicos, por adsorción en una columna de intercambio iónico, por evaporación o por remoción selectiva de agua por congelamiento parcial y/o derretimiento de la solución. Alternativamente, la solución puede ser concentrada por ultrafiltración. Por uso de membranas de poro selectivo pequeñas moléculas

pueden ser removidas (agua, sales, etc.) quedando retenidas las moléculas de proteínas.

Después del paso de precipitación el material debe ser disuelto en pequeños volúmenes de agua o buffer. Frecuentemente hay desnaturalización de las proteínas que pueden ser removidas incrementándose la pureza de la preparación.

En este punto puede utilizarse un gel de filtración o colocarse en una columna sin la necesidad de eliminarse las sales. Estas se eliminan a través de diálisis.

Las fracciones conteniendo la mayoría de la enzima activa son juntadas y concentradas por precipitación con sulfato de amonio o acetona o por ultrafiltración. La solución es entonces dializada toda la noche contra un buffer escogido para la cromatografía del material en una columna de intercambio iónico.

La preparación es cromatografiada en una columna de intercambio iónico usando un gradiente lineal de cloruro de sodio. Las fracciones de la columna conteniendo la mayoría de la enzima activa son juntadas, concentradas, dializadas y puestas en una columna de intercambio iónico que ha sido equilibrado contra un buffer conteniendo 20% menos de cloruro de sodio que el utilizado en la fracción en la cual hubo un pico de actividad enzimática. Las fracciones conteniendo la mayoría de la enzima son juntadas, concentradas y probadas. Si la enzima aun es heterogénea debe considerarse un paso más de purificación utilizando un gel de electroforesis preparado de poliacrilamida.

Cuando la enzima es obtenida en forma pura esta puede ser almacenada a 0°C, congelada y almacenada a -20°C o liofilizada y almacenada a -20°C (12,13).

3.3.6. Criterios de avance y purificación.

Normalmente se selecciona una combinación de métodos para conocer la relación entre la proteína total y la proteína buscada, a la cual se le denomina E (en este caso enzima) y los métodos que nos den una información más exacta para conocer la pureza de la proteína

Existen varios métodos para determinar la concentración de la proteína total y cada uno de ellos presenta sus ventajas y desventajas, a saber

Método Keldahl. Se basa en que las proteínas tienen un contenido promedio de nitrógeno de 15 a 16%. Tiene la desventaja de que las sustancias nitrogenadas no proteicas pueden contribuir a que se haga una estimación errónea. La eliminación de sustancias contaminantes no proteicas hace que este método sea muy lento

Método de microBuret. Está basado en la absorción en ultravioleta de los complejos proteína-cobre (0.2-4 mg). Altamente reproducible e independiente de la naturaleza de la proteína.

Método de la ninhidrina. Se usa en precipitados proteicos y es más sensible que el anterior. (su rango va de 0.01-0.2 mg). Este método se basa en la reacción del grupo amino primario con ninhidrina, que da un producto de condensación violeta. El reactivo es inestable y la reacción también la producen los iones amonio libres

Método de Folin Ciocalteu. Naturaleza cromogénica de las cadenas laterales de aminoácidos (0.01-0.1 mg)

Método de absorción a 280 nm. Debido a la presencia de aminoácidos aromáticos, para evitar la perturbación de ácidos nucleicos, la diferencia de absorción se lee entre 260 a 280 nm.

En casos más problemáticos se puede utilizar la propiedad biológica de algunas proteínas, como la capacidad de unión covalente a otra molécula (llamada ligando),

principio que además de permitirnos su separación, en cromatografía de afinidad, puede permitir cuantificar la enzima.

Es importante tener presente que los análisis deben ser rápidos, reproducibles y sensibles. Sin embargo, a medida que la proteína enzimática se aísla de su microambiente aumenta su susceptibilidad a desnaturalizarse y, por lo tanto, a perder su actividad biológica y sus estructuras superiores.

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 electrofofoque y solubilidad.

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.

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

Actividad específica (U/mg proteína). 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. (13)

3.3.7. Uso e importancia de la β -glucosidasa.

Dentro de los metodos desarrollados para la cuantificación de glucósidos cianogénicos, tenemos desde los gravimétricos, volumétricos y espectrofotométricos hasta el uso de cromatografía de gases (CG), y, en todos ellos se determina los productos de la hidrólisis de estos compuestos, por lo cual es necesario la adición de una fuente de β -glucosidasa exogena

Precisamente en nuestro laboratorio se ha desarrollado un metodo 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 importancia y demasiado costosa lo que en cierta medida limita su uso, por lo tanto he aqui una de las razones de la importancia de esta enzima

La enzima β -glucosidasa es tambien utilizada en el area industrial, como por ejemplo en la produccion de glucosa a partir de celulosa la celulosa es un polimero lineal de unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces 1,4- β -D-glucosidicos El sistema enzimatico para la conversion 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 actua de una manera desordenada en las regiones de baja cristalinidad de la fibra celuloseica, mientras que la celobiohidrolasa remueve las unidades de celobiosa de las terminaciones no reducidas de la cadena celuloseica La β -glucosidasa hidroliza la celobiosa y en algunos casos tambien celooligosacaridos, convirtiendolos en glucosa

La β -glucosidasa generalmente es responsable de la regulacion de todo proceso celulolitico y es un factor limitante durante la hidrólisis enzimática de la celulosa.

ya que la actividad de las otras dos enzimas es frecuentemente inhibida por la celobiosa.

Así que la β -glucosidasa, no sólo produce glucosa a partir de la celulosa, sino que reduce además la inhibición por celobiosa, permitiendo a las enzimas celulolíticas actuar eficientemente. (14,15)

Otra de las aplicaciones de la β -glucosidasa es dentro de la industria alimentaria, como lo es en el procesamiento de los 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 más 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 monoterpenicos

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 aglucónes insolubles, previenen el decoloramiento de los jugos (16)

CAPITULO IV **METODOLOGIA**

4.1. Material de estudio

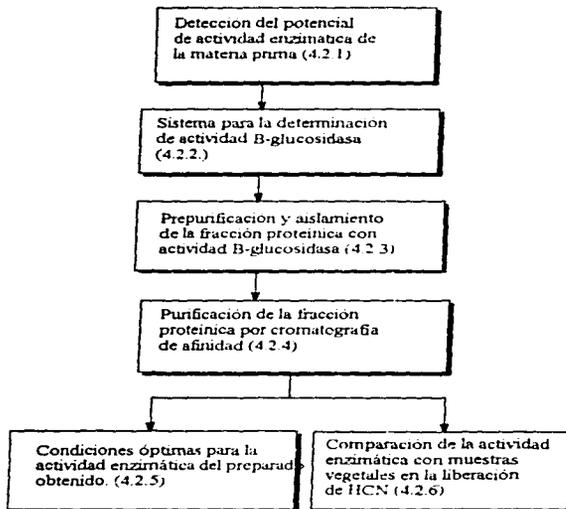
Debido a que el presente trabajo es continuación del desarrollado por Fabiola Ayhllon se aprovecharon resultados previos para la realización de este, dentro de los que destacan: el uso de la misma materia prima y el proceso de purificación y aislamiento preliminar de la fracción proteínica con actividad de β -glucosidasa (19).

Como se deseaba obtener la β -glucosidasa de almendras de semilla de capulín se partió de la respectiva planta (*Prunus serotina*) la cual se obtuvo del mercado de Sonora.

También fue necesario el uso de dos tipos de frijol: Comba y del Monte procedentes de Guerrero y Sinaloa respectivamente, ambas variedad *Phaseolus lunatus*, esto para poder hacer la comparación entre la β -glucosidasa obtenida y la comercial, en la determinación de glucósidos cianogénicos

4.2. Diagrama general de trabajo

Con la finalidad de ver en forma global el presente trabajo, a continuación se presenta un diagrama de bloques, y en seguida una explicación de cada uno de ellos.



4.2.1. Detección del potencial de actividad enzimática.

De trabajos previos queda establecido la actividad enzimática, sin embargo, como se parte de un nuevo lote de almendras de capulín, es necesario confirmar dicha actividad aplicando la metodología de liberación de HCN y la formación de isopurpina de acuerdo a la reacción de Guinard, y para considerar una adecuada actividad enzimática no debe haber diferencia significativa estadísticamente al

realizar la cuantificación de glucósidos cianogénicos con y sin adición de enzima exógena comercial (19).

4.2.2. Determinación de actividad β -glucosidasa.

De datos experimentales previos (19) se tiene establecido el sistema para la determinación de actividad enzimática de la β -glucosidasa por aparición de producto (glucosa); donde se tienen definidos: pH, temperatura y concentración de sustrato. Sin embargo, se realizarán algunas modificaciones, principalmente sobre la concentración de enzima, para mejorar la metodología, tratando de obtener las condiciones del sistema de reacción que proporcione el valor de actividad manifestado para la enzima comercial. Cabe aclarar, que si se modifican las condiciones para la definición de las unidades de actividad, se tendrá que hacer las correcciones pertinentes, incluso desde la materia prima.

Para realizar dicha modificación en la concentración de enzima se determinará la actividad enzimática por medio de la determinación de glucosa, que es uno de los productos de la hidrólisis de los glucósidos cianogénicos, en varios intervalos de tiempo.

De igual forma será necesario realizar la cuantificación de proteína para conocer la actividad específica, de esta manera se sabrá la pureza del aislado enzimático, para lo cual se aplicará el método de Lowry ya que es un método con alta sensibilidad, además de ser muy conveniente cuando se cuenta con poca cantidad de muestra, pues sólo se requiere de 5 a 20 mg de muestra para su ensayo.

4.2.3. Prepurificación y aislamiento de la fracción proteica

Debido a que la β -glucosidasa que es una glicoproteína, se encuentra en la almendra de capulín que posee un alto contenido de grasa (47.5%) se procederá a la concentración de la fracción proteica sustrayendo la fracción lipídica de las

almendras por extracción continua con éter etílico, durante aproximadamente 18 horas, a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. A continuación, el aislamiento de la fracción de glicoproteínas se realizará por extracción fraccionada con el disolvente adecuado. En si se utilizará el procedimiento establecido en el trabajo previo y se procederá a aprovechar dicho material, sin embargo, si se modifica el sistema de cuantificación de unidad de la actividad enzimática, será necesario la corrección de la actividad específica en este preparado

4.2.4. Purificación enzimática

El liofilizado obtenido bajo las mismas condiciones de trabajo previamente descrito se suspenderá en buffer de histidina-HCl, para aplicarlo sobre una columna cuya fase estacionaria será concanavalina A en sacarosa 4B, realizando una separación por cromatografía de afinidad. Para la elución de la enzima se utilizará una solución de α -metil D-glucósido. La fracción eluida con alta actividad de β -glucosidasa se dializará y después se procederá a liofilizar para obtener un producto purificado y estable. Cabe aclarar que se puede realizar una purificación más profunda, incluso separar la amigdalina-hidrolasa de la prunasa-hidrolasa, sin embargo, para los fines perseguidos, lo anterior no será conveniente ya que se desea obtener un preparado que contenga una actividad de β -glucosidasa global. En esta etapa se pretende mejorar sustancialmente la actividad específica de este preparado con respecto al obtenido del trabajo previo.

4.2.5 Condiciones óptimas

Del liofilizado obtenido de la separación cromatográfica por afinidad, se procederá a determinar sus condiciones óptimas de actividad enzimática (cinética enzimática), para lo cual se utilizará el sistema definido en la fase 4.2.2, donde se mantendrá la concentración de enzima, siendo esto en base al contenido de proteína. Se

estableceran pH y temperatura óptima, así como la constante de afinidad (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}) para la amígdalina, el cual es un glucósido cianogénico de interés en alimentos y del presente trabajo.

4.2.6. Comparación de la actividad enzimática

Ya que el objetivo principal del presente trabajo es obtener un preparado enzimático estable que pueda sustituir a la enzima comercial en la determinación espectrofotométrica de glucósidos cianogénicos que ya se tiene establecido, se realizará una comparación entre ambas enzimas usando dicha determinación. Para lo cual se utilizarán tres muestras que contengan glucósidos cianogénicos de interés en alimentos y posteriormente realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos; con el fin de observar si existe diferencia significativa estadísticamente.

4.3. METODOS UTILIZADOS

4.3.1. 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 (20).

Equipo y material

Digestor Supelco cat. N° 3-3315

Espectrofotómetro Sequoia-Turner modelo 340

Tubos de pared gruesa para cultivo Pyrex #9825

Tapones de rosca con cubierta de teflón

Pipeta automática Labsystems de 200-1000 µl

Reactivos y soluciones

Solución de ácido benzoico al 0.14% (m/v) (d)

Patrón de reserva de glucosa (e)

Patrones de trabajo de glucosa (f)

Reactivo de coloración de o-toluidina (Merck cat. 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 solución de ácido benzoico y aforar a 250 ml con la misma solución.

(f) Tomar alícuotas de 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0, 22.5 y 25.0 ml del patrón de reserva de glucosa (e) y aforar cada una a 50 ml con solución de ácido benzoico.

Procedimiento

Se pipetea 3 ml de reactivo de coloración en una serie de tubos de vidrio de pared gruesa, preferentemente con tapas de rosca forradas de teflón. Con micropipeta se añaden a los tubos 500 µl (0.5 ml) de cada uno de los patrones de trabajo de glucosa. Para el blanco se adiciona 500 µl de solución de ácido benzoico. 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 absorbancia del contenido de cada tubo frente al blanco a 630 nm, para obtener la curva de calibración.

4.3.2. Determinación de proteína

Modificación del método de Lowry que da una respuesta fotométrica lineal.

FUNDAMENTO. Se basa en la reacción del fosfomolibdato, en solución alcalina, con los residuos de tirosil de las proteínas; 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 650 nm (21)

Equipo y material

Baño de agua con termostato y homogenizador marca Grant, mod. SE 10

Pipeta automática Labsystems de 200-1000 μl

Pipeta automática Labsystems de 50-100 μl

Cronómetro

Espectrofotómetro Sequoia-Torner mod. 340

Fotoceldas 19X105 nm.

Reactivos y soluciones

Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma cat. 2790)

Hidróxido de sodio 1.0 N

Albúmina bovina (Sigma cat. A-3425)

Solución A, tartrato de sodio y potasio y carbonato de sodio (g)

Solución B, tartrato de sodio y potasio y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (h)

Solución C (i)

Preparación de soluciones:

(g) Solución A: Se disuelven 2 g de tartrato de sodio y potasio y 100 g de carbonato de sodio en 500 ml de solución 1 N de hidróxido de sodio para después aforar a 1000 ml con agua.

(h) 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 agua para aforar después a 100 ml con la solución 1 N de hidróxido de sodio.

(i) Solución C: Un volumen del reactivo de Folin-Ciocalteu se diluye en 15 volúmenes de agua. Esta solución se prepara diariamente y debe tener una normalidad

entre 0.15N y 0.18N cuando se titula a pH 10 con NaOH 1N. Si la acidez fuese mayor a 0.18N deberá ser ajustada con NaOH

El tartrato de sodio y potasio se divide entre ambas soluciones A y B, para evitar una cristalización en B, además de mantener la concentración de tartrato necesaria.

Procedimiento

Para la curva estándar se utiliza una solución de albúmina bovina cuya concentración equivale a 360 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en agua 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 llevan a 1 ml con agua destilada, se colocan en tubos con su correspondiente etiqueta y se les adiciona 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 minutos) y puedan ser tratados con 0.1 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 nuevamente colocados en el baño de agua a 50°C por 10 minutos y enfriados a temperatura ambiente, para finalmente proceder a la lectura de las absorbancias a 650 nm.

TUBOS PARA LA CURVA ESTANDAR

Tubo	μl soln. estándar	μl de agua	Concentración (μg)
B	0	1000	0
1	25	975	9
2	50	950	18
3	75	925	27
4	100	900	36
5	200	800	72
6	300	700	108
7	500	500	180
8	700	300	252
9	900	100	324

4.3.3. Curva de actividad de la β -glucosidasa comercial

FUNDAMENTO. La hidrólisis de la 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, en este caso se hizo por cuantificación espectrofotométrica al reaccionar con o-toluidina. Ya que la reacción es dependiente del tiempo se tendrá un control de este, además se

controlaran la concentración de amigdalina (sustrato) y enzima, así como del pH, temperatura y adición de ciertos activadores. (19)

Equipo y material

Baño de agua con termostato y homogenizador marca Grant mod. SE 10

Vórtex 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% (v/v)

Amigdalina (Sigma cat. A-6005)

β -glucosidasa (Sigma cat. G-0395)

Nitrato de sodio (R.A.)

Buffer de citrato-fosfato pH 5.0 ± 0.1 (a)

Solución de amigdalina (b)

Solución de β -glucosidasa comercial (c)

Preparación de soluciones:

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

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

(c) Mezclar 102.5 mg de β -glucosidasa y 3.4 g de nitrato de sodio (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 ensayo (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, agitando de inmediato con ayuda del vórtex esto 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.

A partir del segundo tubo y hasta el octavo se les adiciona 4 ml de solución de amigdalina e inmediatamente se agita con el vórtex, midiendo con cronómetro el tiempo de reacción. A los 30 segundos 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 vórtex. Se sigue el mismo procedimiento del segundo tubo con los 7 tubos restantes pero deteniendo la reacción a 1, 2, 5, 10, 15, 30 y 45 minutos. 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.

4.3.4. Actividad de la β -glucosidasa obtenida y purificada de la almendra de semilla de capulín

Fundamento, material, equipo, reactivos y soluciones son los mismos descritos en el apartado 4.3.3., variando únicamente la presencia de la β -glucosidasa comercial por la purificada a partir de la almendra de semilla de capulín, colocando la cantidad de enzima de acuerdo al contenido de proteína previamente determinado.

Procedimiento

Es el mismo utilizado que en la curva de la β -glucosidasa comercial, con las siguientes condiciones: temperatura 37°C, pH 5.0, volumen total del sistema 6 ml y con el tiempo de reacción más adecuado de la fase anterior (4.3.3).

Para asegurar una concentración igual a la β -glucosidasa comercial se adicionará una cantidad extra en base al contenido de proteína, ya que no toda tiene actividad enzimática.

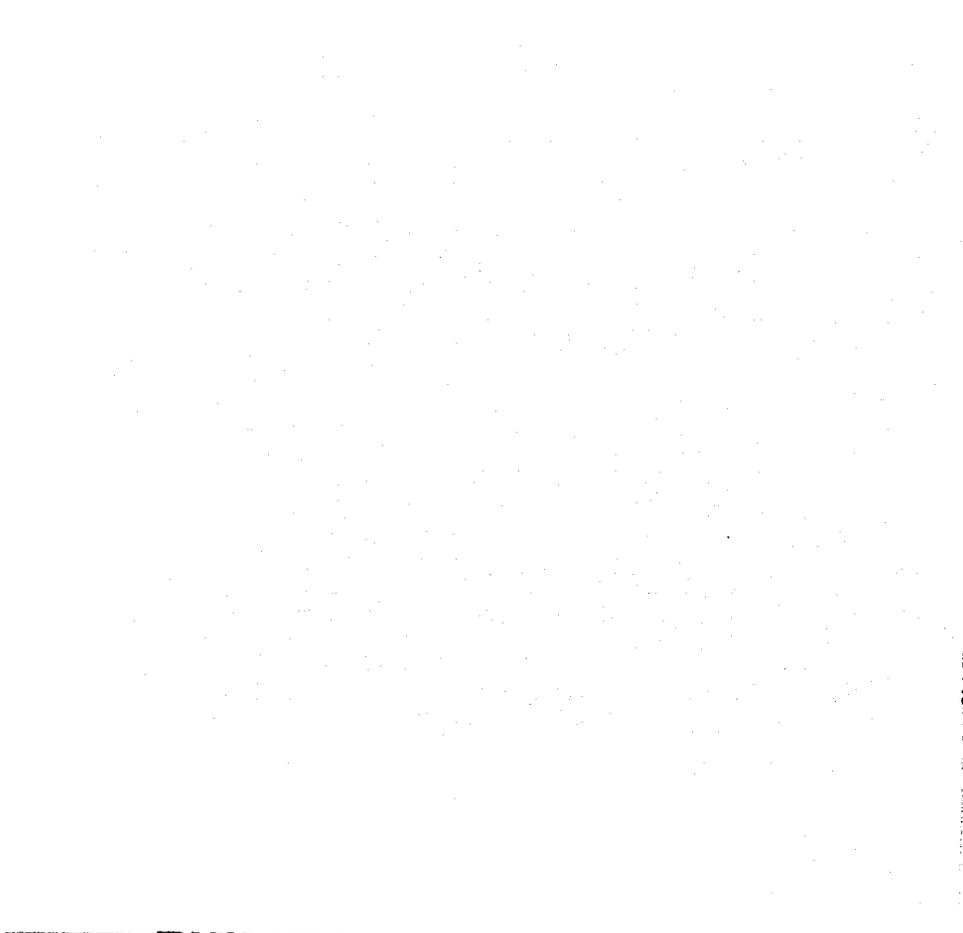
Como este paso será aplicado después de haber realizado la cromatografía de afinidad en donde se obtendrán varias fracciones eluidas, y cada una de ellas contiene diferente cantidad de proteína y actividad, no será sino hasta dicho paso cuando se especifique la cantidad de preparado enzimático a usar para poder determinar su actividad, por fracción.

El tiempo de reacción será en base al que haya proporcionado una alta actividad en la curva de la β -glucosidasa comercial así como una buena manipulación; para posteriormente tomar una alícuota por tubo, y así poder determinar a los eluyentes el contenido de glucosa por el método de la o-toluidina.

4.3.5. Obtención de un extracto purificado con actividad de β -glucosidasa

Purificación por medio de cromatografía de afinidad

FUNDAMENTO. Se basa en la propiedad química que algunas proteínas poseen, su capacidad de unión específica no covalente con otra molécula llamada ligando (9). En este caso la concanavalina A sefárosa 4B tiene un receptor específico para el azúcar de la β -glucosidasa, de tal forma que ésta se quedará unida específicamente al soporte mientras que alguna otra enzima que se encuentre presente en la solución y que carezca del centro específico de unión para la concanavalina A sefárosa 4B,



FALTA PAGINA

No.

46

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

III. Lavar con agua caliente (60°C) durante 2 minutos.

IV. Acidificar con la solución de H_2SO_4 0.2% enjuagar con agua caliente para remover el ácido, hasta cerciorarse de que el agua de enjuague no tenga pH ácido.

(k) Disolver 3.10 g de histidina en aproximadamente 800 ml de agua desionizada, una vez disuelto adicionar 19.87 g de NaCl y ajustar pH a 6.0 con solución de HCl 1N y completar el volumen de 1000 ml con agua desionizada

(l) Disolver 9.71 g de α -metil-D-glucósido en 500 ml de buffer 0.01 M histidina (k).

Procedimiento

Pesar de 2-3 g de enzima semipurificada y redissolver en un mínimo de volumen con buffer 0.01M de histidina (l), agitar con precaución para no crear mucha espuma; aplicar a la columna la cual se encuentra ya empacada con la concanavalina A en sefarsa 4B y preequilibrada con buffer 0.01 M de histidina, lo que consiste en un lavado con 10 veces el volumen muerto de la columna, siendo equivalente a 50 ml aproximadamente. Eluir con buffer 0.01 M de histidina con 0.2 M α -metil-D-glucósido con un flujo de 1 ml/min aprox. Colectar fracciones de 20 ml, y determinarles actividad enzimática y proteína, para conocer su actividad específica por fracción, de esta forma se podrá determinar hasta que momento debiera eluirse.

Las fracciones que contengan alta actividad son colectadas y dializadas contra agua desionizada en refrigeración durante toda la noche, en una sola membrana

La solución enzimática dializada se centrifuga por 5 minutos a 17,600 g (10,750 rpm), y el sobrenadante se pasa por un filtro de porosidad media (10-15 μ), para eliminar cualquier partícula ajena a la β -glucosidasa. Finalmente esta solución se liofiliza a -50°C, presión reducida de 25 micrones y en fracciones de 25 ml para un liofilizado eficiente.

Se realizan determinaciones de actividad y proteína, tanto al extracto semi-purificado, como a las fracciones de la columna y al liofilizado para tener un seguimiento de purificación mediante la actividad específica de la enzima

4.3.6. Condiciones óptimas

A continuación se describen los ajustes que deben realizarse para establecer las condiciones óptimas para la actividad enzimática del preparado obtenido; realizando cada nivel de variación como mínimo por triplicado, y utilizando el tiempo ya establecido como óptimo (aquel que presente buena actividad y sea fácil de manipular).

Determinación de temperatura óptima.

Se realizarán varios niveles de temperaturas que serán: 20°, 30°, 37°, 40°, 50°, 60° y 70°C. Siguiendo la misma metodología que en la determinación de actividad de la β -glucosidasa, pero ahora durante la incubación se probará con cada una de las temperaturas indicadas.

Determinación de pH óptimo

La determinación de actividad se lleva a cabo como ya se mencionó, utilizando un buffer de citrato fosfato pero cambiando el pH del buffer utilizado por 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0; haciendo uso de un potenciómetro para el ajuste del buffer previamente.

Determinación de K_m y V_{max} para amigdalina

Una vez obtenido el pH y la temperatura óptima, así como el tiempo de reacción, se manejan dichos valores para variar la concentración del sustrato (amigdalina) usada en la determinación de actividad de la siguiente forma: 0.0762, 0.3812, 0.7625, 2.2875, 3.8125 y 7.6250 mg/ml, y posteriormente con la ayuda de la

ecuación y de la gráfica de Lineweaver-Burk, obtener tanto al valor de K_m como el de V_{max} para la amígdalina

4.3.7. Método para la determinación cualitativa y cuantitativa de glucósidos cianogénicos

FUNDAMENTO. El presente método aprovecha la reacción sensible y específica de Guinard, la cual es ampliamente utilizada en pruebas cualitativas para la detección tanto de glucósidos cianogénicos como del propio HCN.

Para poder cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática, con adición de enzima exógena (por medio de β -glucosidasa) del correspondiente glucósido cianogénico, y para poder cuantificar en forma precisa el HCN liberado, es conveniente trabajar algunos pasos a temperaturas bajas. (8)

Equipo y material

Incubadora marca Lab line imperial III

Congelador comercial American mod. CV

Espectrofotómetro Sequoia-Torner mod. 340

Baño de agua con agitación marca Lab-line instruments

Tubos de cultivo con tapón de rosca pyrex #9825

Micro-molino marca Tecator mod. Cyclo-Tec

Papel indicador de HCN. (m)

Potenciómetro Cornug mod. 10

Reactivos y soluciones

Solución de β -glucosidasa comercial con activador (n)

Solución de β -glucosidasa obtenida con activador (o)

Solución de KCN equivalente a 100 μg HCN/ml (24.1 mg KCN/100 ml)

Solución de HCl 0.5N

Buffer de fosfatos pH 7.0 (p)

Buffer de citrato-fosfato pH 5.0 (ya descrito en el apartado 4.3.2)

Solución de picrato de sodio alcalinizada (q)

Fécula de maíz comercial

Preparación de soluciones

(m) Papel Whatman del #2 se empapa en una solución de picrato de sodio (q), se deja escurrir y se coloca en una estufa a secar a una temperatura de 55-60°C por espacio de 30 minutos. A continuación se cortan tiras bien medidas de 2X10 cm.

(n) 0.25 g de β -glucosidasa comercial (250 mg) se disuelve con buffer de fosfatos pH 7.0 teniendo la precaución de agitar suavemente (de lo contrario se formará gran cantidad de espuma) una vez disuelta la enzima se le adiciona 1.7 g de NaNO_3 que actúa como activador, 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 0.08M de NaNO_3 .

(o) 7.7 mg de β -glucosidasa obtenida se disuelve con buffer de citrato-fosfatos pH 5.0 teniendo la precaución de agitar suavemente, una vez disuelta la enzima se le adiciona 0.17 g de NaNO_3 , se lleva a un volumen total de 25 ml con el mismo buffer y así se

tiene una concentración de 0.308 mg de β -glucosidasa/ml y 0.08 M de NaNO_3 .

(p) Se prepara una solución 0.2M de fosfato monobásico de sodio (A) (27.8g en 1000 ml de agua destilada y desionizada) y una solución 0.2M de fosfato dibásico de sodio (B) (53.65g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ o 71.7g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 1000 ml de

agua destilada y desionizada). Tomar 39 ml de la solución A y 61 ml de la solución B, diluir a un total de 200 ml; si es necesario se ajusta el pH con un potenciómetro. (q) Se disuelve en agua destilada 2.5 g de ácido picrico y a continuación 12.5 de carbonato de sodio, llevándose a un volumen de 500 ml con agua destilada

Procedimiento

Para la elaboración de la curva de referencia, se usa una solución de KCN cuya concentración equivalga a 100 μg HCN/ml. Además con el fin de simular la interacción muestra-HCN liberada, se introduce en nuestra curva estándar la llamada matriz alimenticia (22), que será fécula de maíz comercial.

TUBOS PARA LA CURVA ESTANDAR

ml solución estándar	matriz alimenticia	Buffer pH 7	40°C/4 h -----	HCl 0.5N en frío	Conc. HCN (μg)
0.0	500 mg	5.0 ml		1.0 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 5-60 μg de HCN, ya que fue el rango óptimo encontrado en la respuesta concentración de HCN vs absorbancia en donde se cumple la ley de Lambert-Beer. Dicha serie de tubos se trabajan en la misma forma que para la liberación de HCN en la muestra

Preparación de la muestra: cuando se requiere determinar con suma precisión el contenido de HCN en una muestra fresca, es necesario partir del material íntegro, para lo cual se somete a una molienda fina e inmediatamente se pasa a un frasco que cierre perfectamente y si no se va realizar en ese momento la determinación se procede a colocar la muestra ya molida en el congelador.

Liberación del HCN de la muestra: se coloca en un tubo de cultivo pyrex de 20 a 500 mg de muestra, dependiendo de su contenido aproximadamente de glucósidos cianogénicos (cuando no se tiene información se coloca la cantidad máxima de 500 mg); a continuación se le adiciona 5.0 ml de la solución de β -glucosidasa (fría) se homogeniza y se procede a colocar la tira de papel indicador humedecido (aprox con 8 gotas de agua) en la boca del tubo y se cierra herméticamente con un tapón de rosca.

Una vez que se tiene el anterior dispositivo se coloca 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 h. Al final de dicho tiempo se saca el tubo y se coloca en el congelador por 30 minutos. Transcurrido el tiempo anterior se saca el tubo y se destapa para adicionarle 1 ml de HCl 0.5N (frío)

Una vez adicionado el HCl, se vuelve a cerrar perfectamente, se homogeniza teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel indicador y se coloca en la estufa por espacio de 15 minutos a la temperatura de 60°C . Transcurrido el tiempo se saca de la estufa y en ese momento se puede realizar visualmente la detección cualitativa, ya que aquellos tubos que muestren una coloración café-rojiza aunque sea muy tenue se consideran positivos y se procede a su detección cuantitativa.

Determinación cuantitativa: con cuidado se procede a recuperar el papel indicador y se coloca en un tubo de cultivo pyrex, se le adiciona 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 minutos) se recupera el disolvente, eliminando los residuos del papel por una simple filtración con papel de filtración rápida. Hay que hacer notar que cuando así se requiera se puede hacer otra adición de agua (20 ml) para extraer completamente el pigmento (dilución)

La solución filtrada se coloca en la fotocelda de 19X105 mm para su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm frente al blanco.

4.3.8. Comparación de la actividad enzimática

Para poder realizar una comparación entre ambas enzimas, la comercial y el preparado enzimático obtenido a partir de la almendra de semilla de capulín, se utilizará el método de glucósidos cianogénicos, descrito en el inciso 4.3.7., utilizando tres muestras de interés que son frijol comba y frijol monte en donde se encuentra el glucósido linamarina, y almendra de semilla de capulín que contiene amigdalina como glucósido.

Cabe aclarar que la determinación de glucósidos cianogénicos se llevara a cabo, tal cual, sustituyendo únicamente a la enzima comercial por el preparado enzimático, siendo necesario cumplir con las condiciones óptimas de temperatura, pH y concentración de enzima obtenidas previamente, para tal preparado.

Por otra parte hay que recordar que se modificó la concentración de la enzima con la finalidad de mejorar la metodología, en base a esto, se espera obtener resultados sin diferencia significativa estadísticamente entre ambas enzimas, cabe hacer notar que se harán los ajustes correspondientes para el caso del preparado enzimático obtenido, con la finalidad de optimizar la metodología previamente descrita

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Detección de actividad enzimática de la materia prima.

Debido a que el presente trabajo es continuación del referido, queda establecido una adecuada actividad enzimática ya que se parte de la misma materia prima y no se encontró diferencia significativa estadísticamente al realizar la cuantificación de glucósidos cianogénicos con y sin adición de enzima comercial.

5.2. Determinación de actividad de β -glucosidasa

Las condiciones del sistema para la cuantificación de la actividad (concentración de enzima: 0.0205 mg/ml, concentración de sustrato :0.7625 mg/ml, temperatura: 37 °C y pH de 5.0 ± 0.1) (19), se modificaron en el presente trabajo aumentando la concentración de la enzima 10 veces respecto a las condiciones ya planteadas, quedando finalmente lo siguiente:

- Concentración de enzima : 0.205 mg/ml
- Concentración de sustrato (amigdalina) : 0.7625 mg/ml
- Temperatura de 37°C
- pH de 5.0 ± 0.1

Al ser cambiadas las condiciones del sistema se tiene que encontrar nuevamente el tiempo óptimo de reacción adecuado a éste, por lo que se comenzó a trabajar a partir del 0.5 min. y hasta los 45 minutos.

Los datos de esta parte experimental se muestran en la tabla 5.1. y su correspondiente gráfica en la figura 5.1, en donde se puede observar, que desde el 0.5 minuto existe una alta actividad específica, y después comienza a descender hasta hacerse asintótica, sin embargo a pesar que desde este momento se contaba con una buena actividad no se tomó como el tiempo óptimo debido a la dificultad de su manipulación, por lo que se consideró a los 5 minutos como un buen tiempo para manipular, además en este lapso se encontró concordancia con el valor reportado en el marbete de la enzima comercial (5.5 U/mg de proteína), por lo que se consideró como el tiempo idóneo para determinar la actividad enzimática

Tabla 5.1. Determinación del tiempo óptimo de reacción

Tiempo de hidrólisis (min.)	Hidrólisis (%)*	Actividad (U/ml)*	Actividad específica* (U/mg proteína)
0.5	8.096±0.689	2.014±0.184	9.830±0.897
1.0	14.315±0.312	1.781±0.041	8.690±0.203
2.0	26.406±1.081	1.642±0.072	8.013±0.352
5.0	41.694±2.675	1.037±0.038	5.061±0.187
10.0	69.270±2.017	0.862±0.027	4.204±0.132
15.0	86.976±2.700	0.721±0.024	3.519±0.120
30.0	95.812±0.307	0.397±0.001	1.938±0.006
45.0	100.0±0.843	0.277±0.002	1.352±0.012

Valor promedio donde n= 3

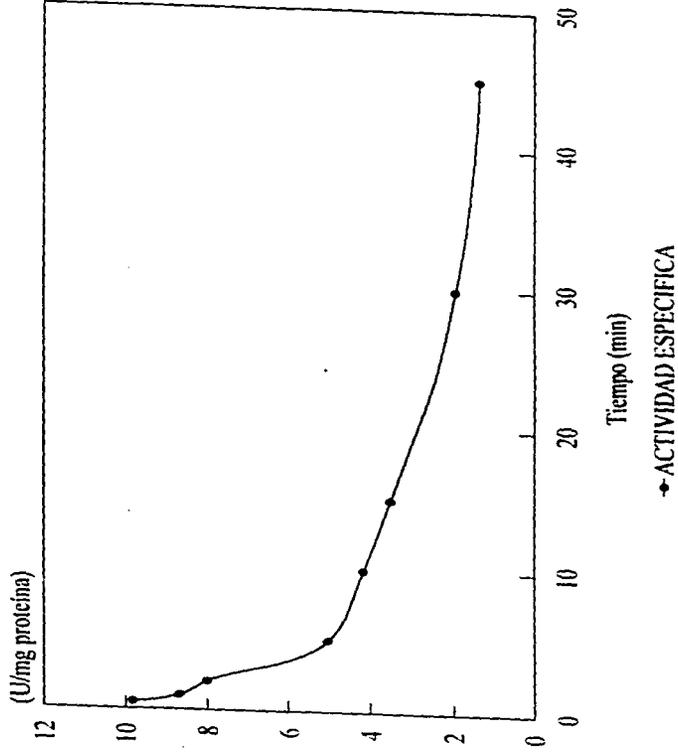


FIG.5.1 DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE HIDROLISIS

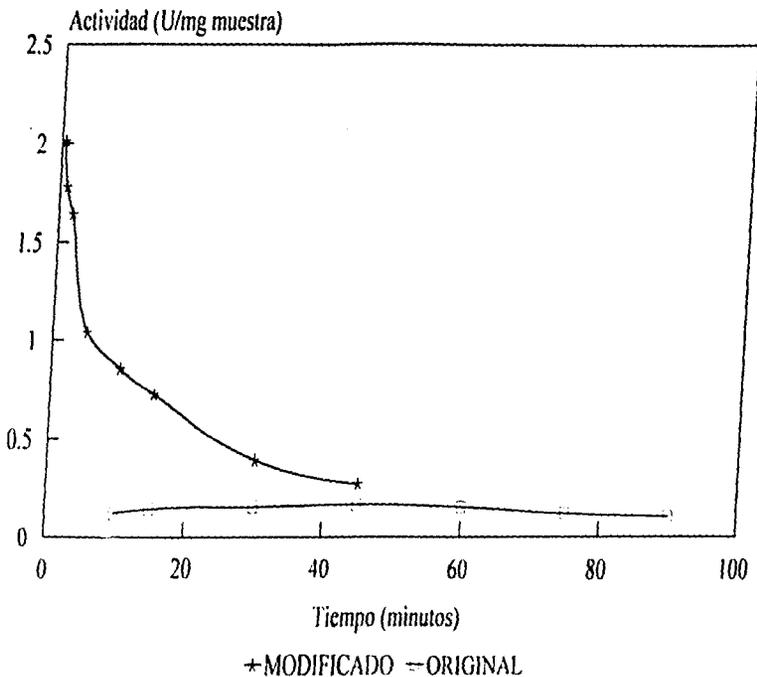
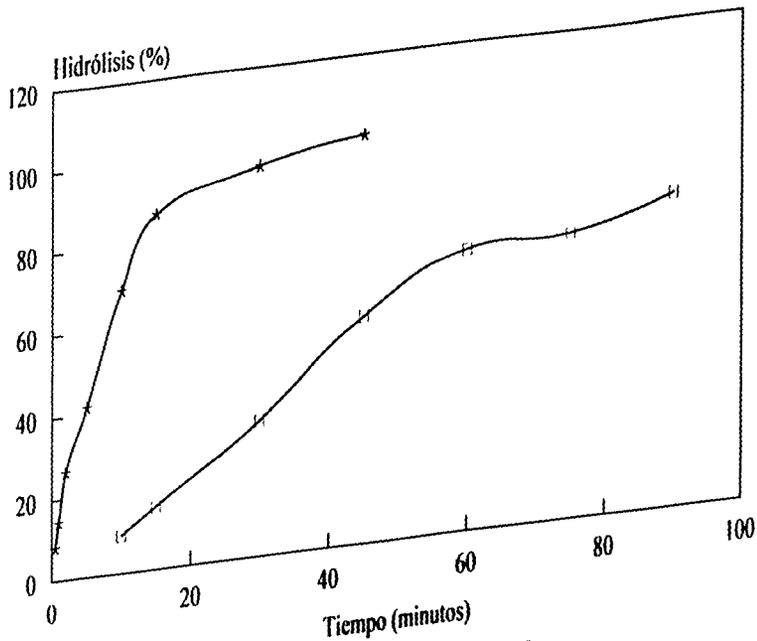


FIG5.2 ACTIVIDAD ESPECIFICA CON SISTEMA ORIGINAL Y MODIFICADO



* MODIFICADO + ORIGINAL

FIG.5.3 PORCENTAJE DE HIDROLISI: SISTEMA ORIGINAL Y MODIFICADO

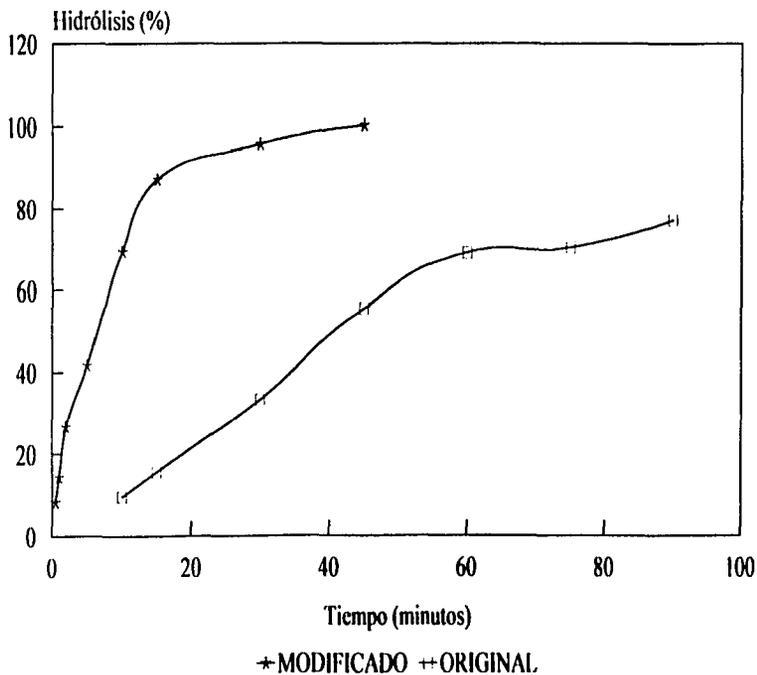


FIG.5.3 PORCENTAJE DE HIDROLISI:SISTEMA ORIGINAL Y MODIFICADO

La gráfica 5.2 muestra una comparación entre las condiciones iniciales manejadas en el trabajo previo con las recién establecidas, donde se muestra que con la concentración de 0.205 mg de enzima/ml, es decir la reestablecida, la actividad específica es mucho mayor a tiempos más cortos en relación a la curva mostrada del trabajo anterior.

Por otro lado en la gráfica 5.3. se observa que a los 45 minutos de reacción ya presenta el 100 % de hidrólisis, cuando con las anteriores condiciones, apenas se logró obtener un 77.17 % como máximo de hidrólisis a los 90 minutos. (19).

Para poder cuantificar el producto de la hidrólisis se realizó como glucosa liberada, utilizando el método de o-toluidina, por lo que fue necesario elaborar una curva estándar de glucosa con un rango de concentración de glucosa de 25 a 250 μg ; la tabla 5.2 muestra los resultados y la figura 5.4, la gráfica obtenida con un coeficiente de correlación lineal de 0.9976

Tabla 5.2. Curva estándar de glucosa

Glucosa (μg)	Densidad óptica (A)
0	0
25	0.112
50	0.228
75	0.360
100	0.480
125	0.602
150	0.685
175	0.826
200	0.852
225	1.048
250	1.170

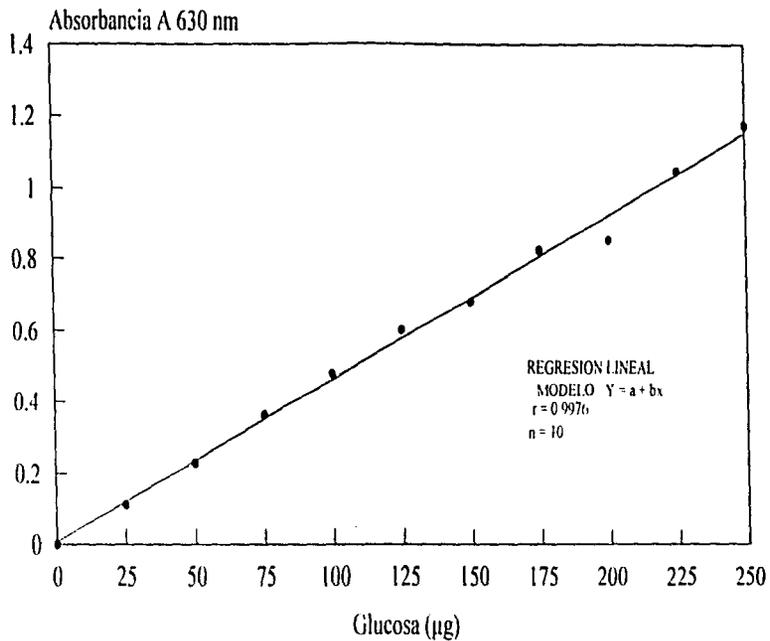


Fig.5.4 CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA

5.2.1. Determinación de actividad inicial en harina desengrasada de almendra.

Debido a que fueron modificadas las condiciones para la definición de las unidades de actividad, fue necesario determinar la actividad β -glucosidasa en la harina desengrasada de almendra, que fue el material de partida; por el método ya descrito, pero utilizando ahora 5 minutos como el tiempo óptimo de reacción. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 5.3, esta será nuestra referencia inicial para llevar a cabo una secuencia de purificación.

Tabla 5.3. Actividad inicial en material íntegro y desengrasado

	Actividad (U/mg muestra)	Actividad específica (U/mg de proteína*)
Almendra de capulín íntegra	0.432	1.30
Harina desengrasada de almendra de capulín	0.810	1.33

*Tomando 61% de proteína reportado (19)

5.3 Prepurificación y aislamiento de la fracción proteica.

Una vez conocida la actividad se procedió a realizar la prepurificación y aislamiento de la fracción proteica (descrito en el apartado 4.2.3.). Debido a la modificación realizada en el sistema de cuantificación de unidad de actividad fue necesario hacer la corrección de la actividad específica en este preparado, obteniendo los siguientes parámetros, actividad (U/mg muestra): 0.557 y actividad específica (U/mg de proteína): 2.73.

5.4 Purificación enzimática

El material ya descrito, se purificó, utilizando la cromatografía de afinidad (descrita en el apartado 4.3.5.), donde se partió de 2.51 g de material que fue resuspendido en 200 ml de buffer de histidina 0.01M. De aquí se obtuvieron 10 fracciones, la primera de 50 ml, debido a que se comenzaba a eluir, y sólo presentaba un alto contenido de proteína pero baja en actividad específica, el resto de las fracciones fueron de 20 ml para llevar a cabo un monitoreo más preciso de ambos factores. A cada fracción fue necesario calcular su actividad específica, ya que no se contaba con referencia alguna, con el fin de determinar hasta que momento era necesario eluir y qué fracciones contenían mayor actividad para seleccionarlas.

Los datos correspondientes se muestran en la tabla 5.4 y la gráfica en la figura 5.5, con los resultados de proteína, actividad y actividad específica.

5.4 Purificación enzimática

El material ya descrito, se purificó, utilizando la cromatografía de afinidad (descrita en el apartado 4.3.5.), donde se partió de 2.51 g de material que fue resuspendido en 200 ml de buffer de histidina 0.01M. De aquí se obtuvieron 10 fracciones, la primera de 50 ml, debido a que se comenzaba a eluir, y sólo presentaba un alto contenido de proteína pero baja en actividad específica, el resto de las fracciones fueron de 20 ml para llevar a cabo un monitoreo más preciso de ambos factores. A cada fracción fue necesario calcular su actividad específica, ya que no se contaba con referencia alguna, con el fin de determinar hasta que momento era necesario eluir y qué fracciones contenían mayor actividad para seleccionarlas.

Los datos correspondientes se muestran en la tabla 5.4 y la gráfica en la figura 5.5, con los resultados de proteína, actividad y actividad específica

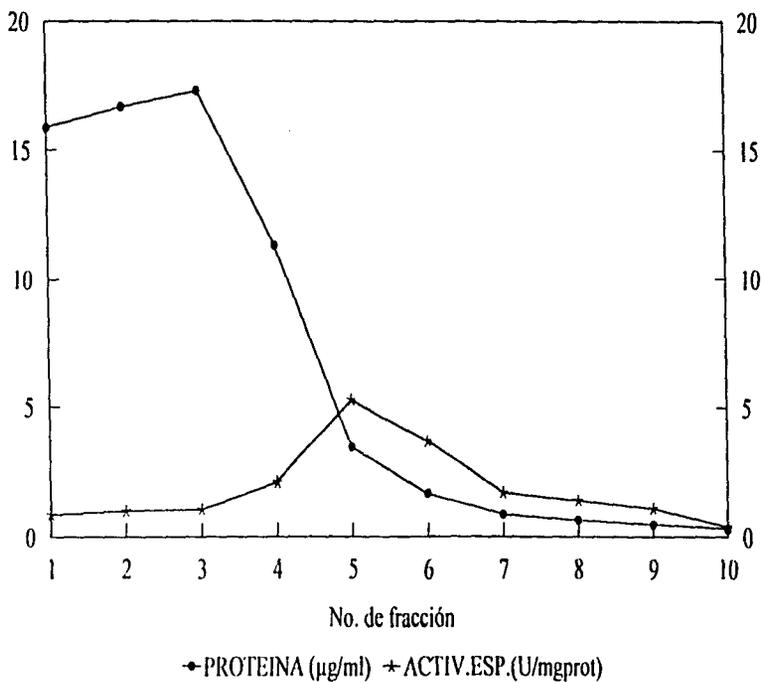


FIG.5.5 PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

En la gráfica se puede observar que al inicio se eluían fracciones con alto contenido de proteína, pero con baja actividad específica, lo cual es lógico, considerando que en la columna cromatográfica no sólo contiene la β -glucosidasa como única proteína, sino que están presentes algunas más. Conforme se sigue el proceso de elución la actividad específica aumentó, al mismo tiempo, que la proteína disminuía ligeramente, debido a que ya se eluyó proteína con baja actividad específica. Al final de la elución se muestra que tanto proteína como actividad son valores ya muy bajos con respecto a los valores centrales

Como se deseaba obtener una buena actividad específica se colectó de las fracciones 4 a la 7 como se ve en la gráfica, ya que fueron las que mostraron un mayor valor de actividad específica; se juntaron para dializar durante toda la noche en una membrana de celulosa, contra agua desionizada posteriormente se liofilizó obteniendo un producto final de 430.7 mg de material purificado lo que nos da un rendimiento de proteína de 13.88 % con respecto a la F.P. II.

Ya que fue necesario determinar proteína a cada fracción para conocer la actividad específica, se utilizó el método de Lowry, siendo necesario la elaboración de una curva estándar de proteína, ésta se muestra en la tabla 5.5, su respectiva gráfica se observa en la figura 5.6, obteniendo un coeficiente de correlación lineal de 0.9955

Como se usó un rango muy amplio de concentración de proteína fue necesario realizar una partición de la curva estándar, para tener mayor precisión al momento de interpolar al mismo tiempo que se mejoró el coeficiente de correlación lineal, lo cual está de acuerdo por lo manifestado por Hartree, E.F. (21)

La forma en que se dividieron los datos fue de 0-36 μ g de proteína y de 37-324 μ g, las gráficas correspondientes se muestran en las figuras 5.7 y 5.8.

Tabla 5.5. Curva estándar de proteína

Proteína (µg)	Densidad óptica (A)
0	0
9	0.047±0.002
18	0.110±0.012
27	0.148±0.002
36	0.208±0.001
72	0.339±0.001
108	0.479±0.002
180	0.760±0.001
252	0.951±0.003
324	1.166±0.002

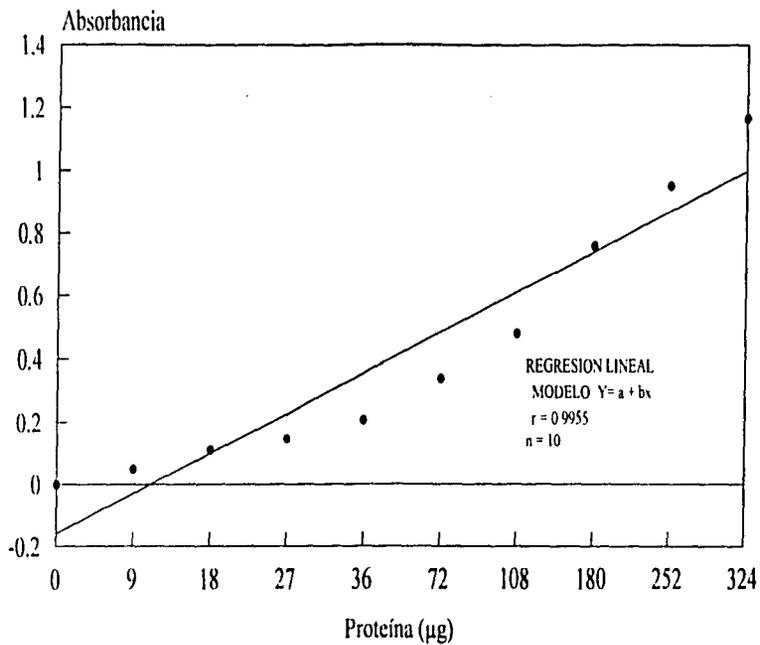


FIG.5.6 CURVA ESTANDAR DE PROTEINA (GLOBAL)

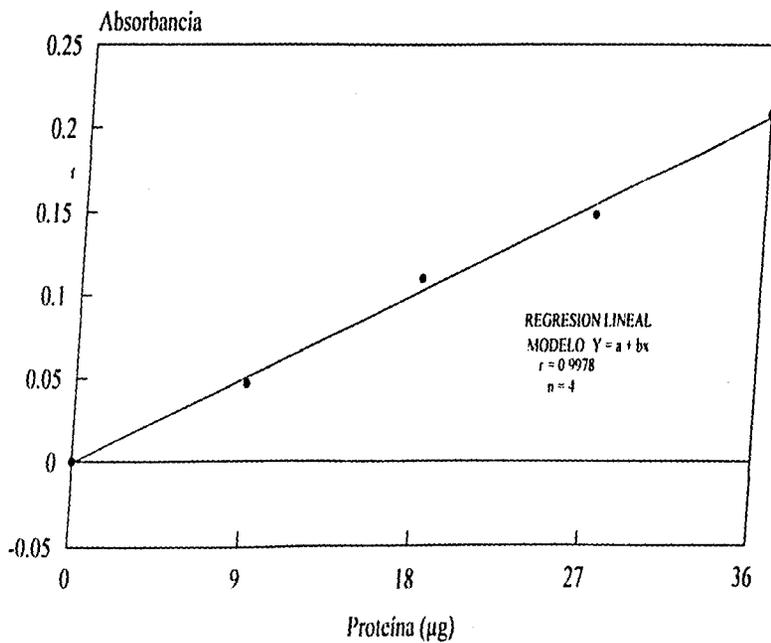


FIG.5.7 CURVA ESTANDAR DE PROTEINA DE (0-36 μg)

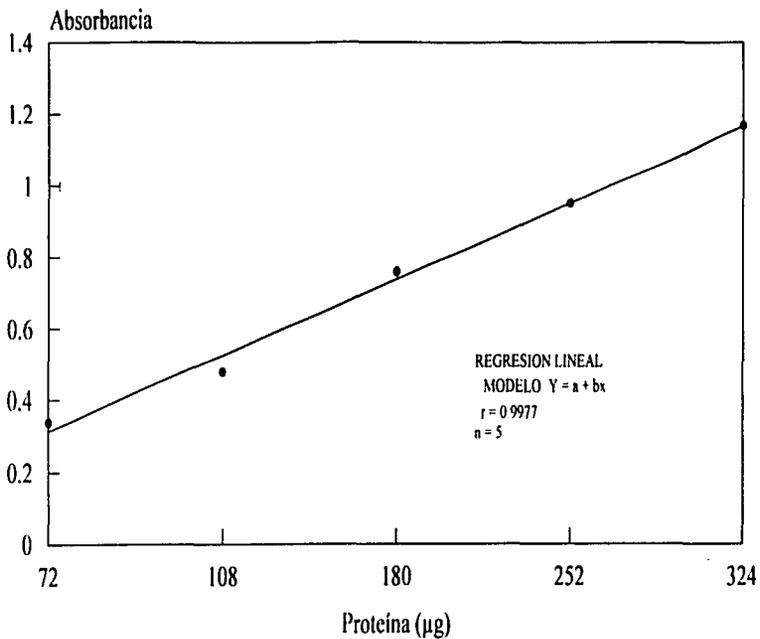


FIG.5.8 CURVA ESTANDAR DE PROTEINA DE (72-324 μg)

5.4.1. Avance de purificación.

Con el fin de tener una secuencia en el proceso de purificación se muestra un resumen en la tabla 5.6.

Tabla 5.6. Avance de purificación

	Proteína (%)	Actividad (U/mg muestra)	Actividad específica (U/mg proteína)
ALMENDRA INTEGRAL	34.00	0.432	1.30
HACD*	61.0	0.810	1.33
F.P. I	67.10	0.790	1.81
F.P. II	72.53	0.56	2.73
F.P. III	68.0	1.56	7.65

*HACD, corresponde a la harina de almendra de capulín descengrasada.

La F.P. I corresponde a la fracción protéica que se obtiene en el proceso después de realizar la filtración, la F.P. II corresponde a la fracción que se obtiene después de dializar, y la F.P. III corresponde a la fracción que se obtiene después de aplicar a la columna de cromatografía de afinidad y de dializar.

En esta tabla se puede ver que el contenido de proteína se va incrementando, sin embargo en la F.P. III este disminuyó lo cual pueda deberse a la selección de proteína que se realizaba al momento de llevar a cabo la purificación; la determinación de proteína fue necesaria ya que es importante cuantificar la actividad β -glucosídica en términos de actividad específica.

Como ya se mencionó la actividad específica es uno de los criterios de avance en un proceso de purificación enzimática, y en la tabla 5.6 se puede ver que en cada una de

de las etapas éste valor aumentó, hasta que en la F.P. III se logró incrementar en casi 6 veces la actividad específica con respecto a la almendra de capulín.

5.5. Condiciones óptimas.

Con el liofilizado obtenido (F.P. III), se preparó una solución de 7.7 mg/25 ml en buffer de citrato-fosfato, es decir una concentración de 0.308 mg F.P. III/ml.

Se realizó la determinación de actividad a dicha concentración después de conocer su contenido protéico, y verificar que se tiene 203 µg de proteína/ml, lo cual es muy cercano al valor que se manejó en la determinación de actividad de la β-glucosidasa comercial (205 µg), de donde ya conocíamos el sistema de reacción para la cuantificación de las unidades de actividad, de tal forma que se procedió a determinar la temperatura óptima, utilizando la metodología ya descrita, variando la temperatura de incubación como ya se describió en la metodología

La tabla 5.7 muestra los valores obtenidos, y en la figura 5.9 se puede observar la gráfica de actividad vs temperatura, donde se muestra un pico a los 37 °C, que es la reportada en la bibliografía como óptima (11), sin embargo se muestra otro pico a los 50°C que es mayor al anterior, y por lo tanto será el registrado como óptimo para nuestro material purificado. Estos dos picos pueden deberse a la presencia de la amígdalin hidrolasa y prunasin hidrolasa que son los constituyentes principales del sistema enzimático de la β-glucosidasa, así cada pico corresponde a cada una de las enzimas mencionadas (23).

Tabla 5.7. Determinación de temperatura óptima

Temperatura (°C)	Actividad específica (U/mg proteína)*
20	2.89±0.155
30	4.97±0.077
37	7.65±0.120
40	7.26±0.261
50	8.59±0.289
60	7.57±0.2825
70	0.99±0.219

*Valor promedio donde n=3

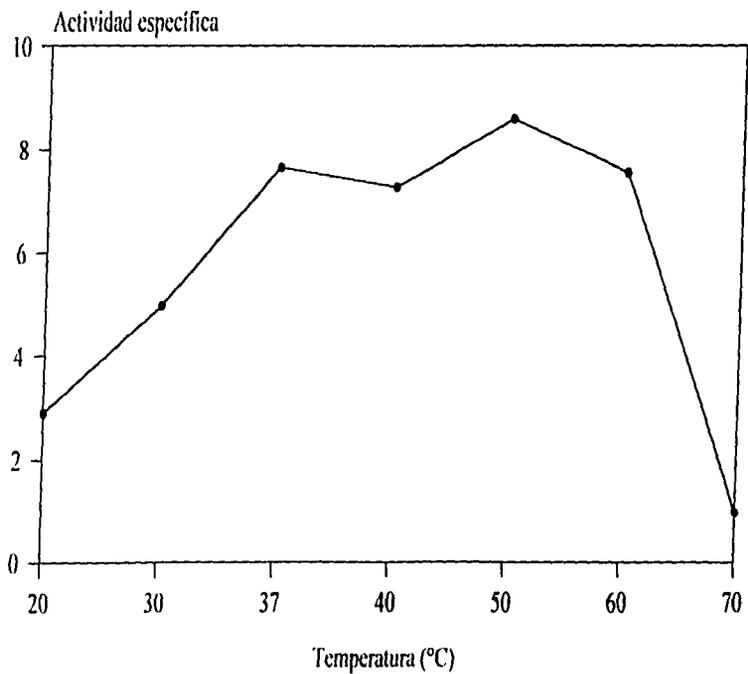


FIG.5.9 GRAFICA DE ACTIVIDAD ESPECIFICA VS. TEMPERATURA

Para establecer el pH óptimo en la cuantificación de actividad, se utilizó el mismo buffer de citrato-fosfato, ajustando el pH con HCl en el rango adecuado para estas sales y considerando el tiempo óptimo de reacción de 5 minutos. Los resultados se muestran en la tabla 5.8 junto con la gráfica de actividad vs pH, figura 5.10, donde puede observarse un sólo pico y es a un valor de pH 5.0.

Tabla 5.8. Determinación de pH óptimo

pH	Actividad específica (U/mg proteína)*
3.0	0.93±0.042
4.0	5.76±0.049
5.0	7.65±0.120
6.0	5.48±0.261
7.0	2.06±0.042

*Valor promedio donde n= 3

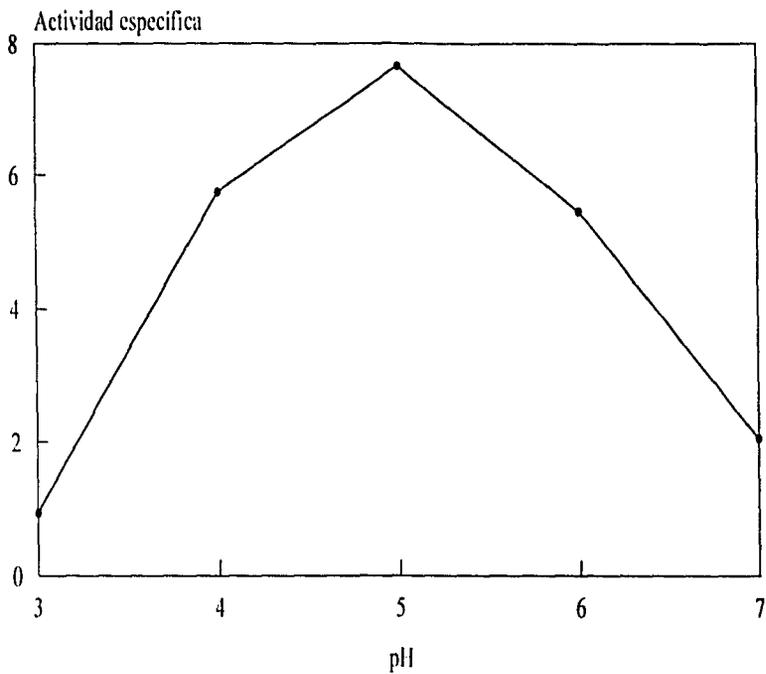


FIG.5.10 GRAFICA DE ACTIVIDAD ESPECIFICA VS. pH

Con las condiciones optimas obtenidas tiempo de 5 minutos, temperatura de 50 °C y pH de 5.0, se llevó a cabo la determinación de los parametros cineticos, como son Km y Vmax para el glucosido cianogenico amigdalina como sustrato

Como el valor de Km corresponde a la constante de afinidad para el sustrato, en este caso amigdalina, se realizo la cuantificacion de actividad utilizando varias concentraciones de amigdalina La tabla 5.9 muestra los valores obtenidos de actividad para cada concentración de amigdalina, la figura 11 muestra la gráfica de actividad especifica (velocidad) vs concentración de amigdalina ([sustrato]), obtenida con los datos ya descritos, de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten, donde se advierte la tendencia de hacerse asintótico a concentraciones altas de sustrato (Vmax)

Tabla 5.9. Datos para graficar la ecuación Michaelis-Menten

[Amigdalina] mg/ml	Velocidad (U/mg proteína)
0.0762	1.135±0.092
0.3812	5.855±0.176
0.7625	9.865±0.106
2.2875	13.205±0.176
3.8125	16.915±0.063
7.6250	19.070±0.304

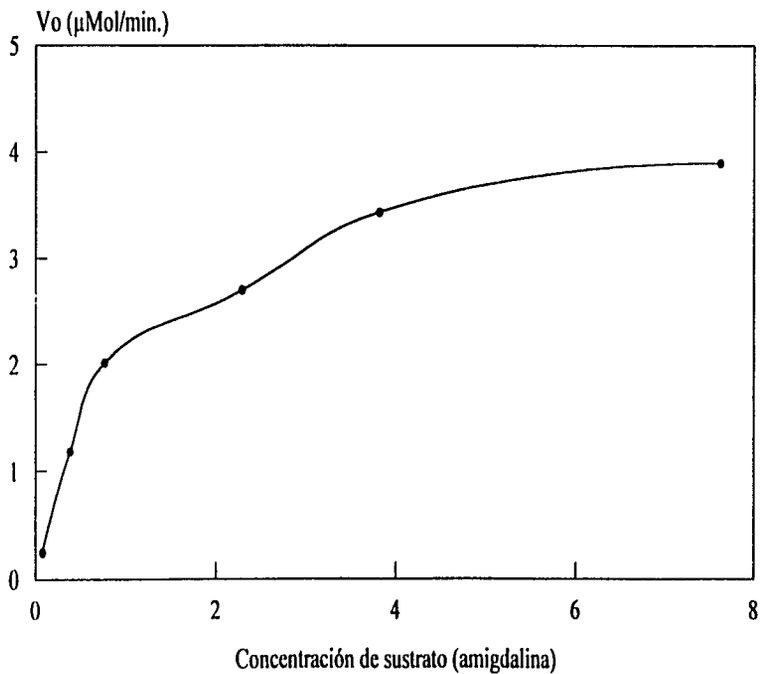


FIG.5.11 REPRESENTACION GRAFICA DE MICHAELIS-MENTEN

Para poder obtener los valores de K_m y V_{max} se realizó la representación gráfica de Lineweaver-Burk con el inverso de los datos ya obtenidos, es decir $[Amigdalina]^{-1}$ vs $Actividad^{-1}$, la gráfica que representa los datos mostrados se ve en la figura 5.12, con un coeficiente de correlación lineal de 0.9999, lo que indica una adecuada respuesta con la finalidad de obtener los parámetros cinéticos mencionados, los datos se observan en la tabla 10

Tabla 5.10. Datos para graficar la ecuación de Lineweaver-Burk

[Sustrato]⁻¹ (μMol^{-1})	Velocidad⁻¹ ($\mu\text{Mol}^{-1} \cdot \text{min.}$)
5.26	4.31
1.01	0.84
0.60	0.50
0.45	0.37
0.35	0.29
0.31	0.25

Recordando que la ecuación de Lineweaver-Burk está descrita como:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}S} + \frac{1}{V_{max}}$$

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

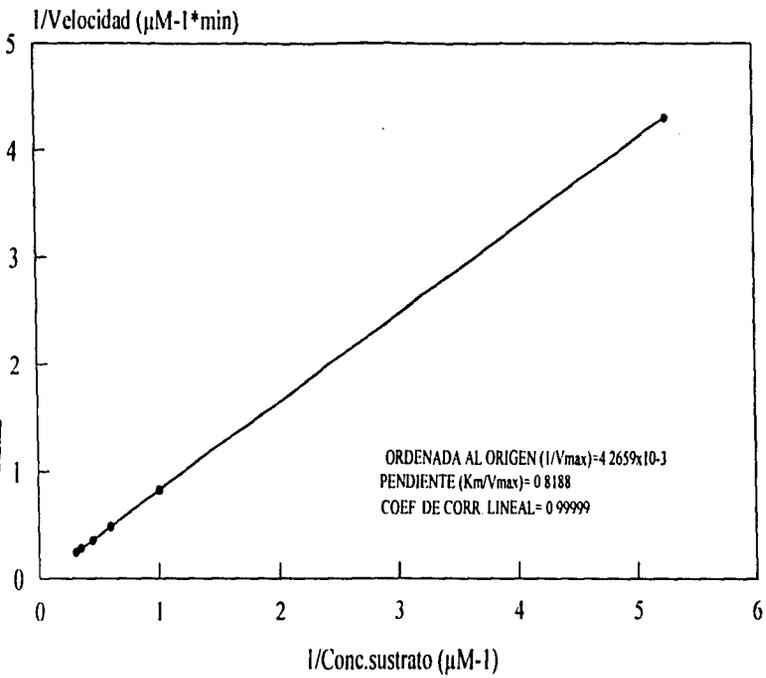


FIG.5.12 REPRESENTACION GRAFICA DE LINEWEAVER-BURK

Se tiene que el dato de la ordenada al origen nos proporciona la V_{max} ; por consiguiente a partir de la pendiente de la representación lineal podemos obtener la K_m (constante de Michaelis).

- V_{max} es igual a 68.58 mMol/hr/mg proteína.
- K_m es igual a 191.94 μ Mol

Considerando que para el caso de la amigdalina se encuentra reportado (Kuroki, G.W.) un valor de K_m de 1980 μ mol y una V_{max} de 39.2 mmol/l/mg de proteína, los datos obtenidos se pueden considerar aceptables, tomando en cuenta que el valor de K_m nos indica la afinidad que tiene la enzima por el sustrato, y cuanto menor sea su valor, menor será la concentración de sustrato para la cual la enzima alcanza su valor máximo de velocidad. (14)

5.6. Comparación de la actividad enzimática

Para la siguiente etapa experimental se elaboró una curva estándar de HCN, en la tabla 5.11 se señalan los datos obtenidos y la gráfica con un coeficiente de correlación lineal de 0.9906 como se observa en la figura 5.13.

Tabla 11. Curva estándar de HCN

HCN (μ g)	Densidad óptica (A)
0	0
5.0	0.035
10.0	0.079
20.0	0.147
40.0	0.249
60.0	0.323

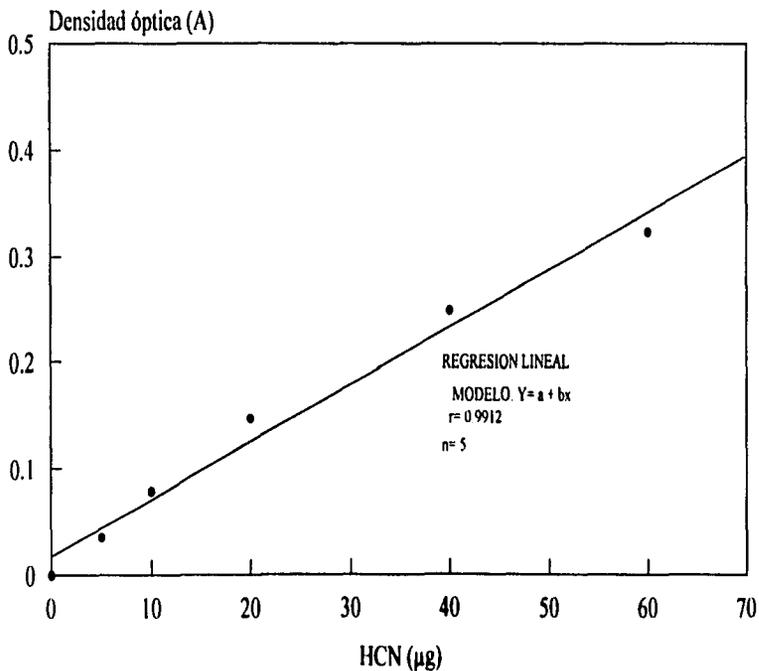


FIG. 5.13 CURVA ESTANDAR DE HCN LIBERADO

Posteriormente se realizó la determinación de glucósidos cianogénicos con adición de enzima comercial, en las muestras descritas en el inciso 4.1 (material de estudio), bajo las siguientes condiciones de trabajo:

[β -glucosidasas]= 1 mg/ml

Buffer de fosfatos pH 7.0

Temperatura de incubación de 40 °C

Tiempo de hidrólisis de 4 horas

A continuación se muestra en la tabla 5.12 los resultados obtenidos.

Tabla 12. Liberación de HCN utilizando β -glucosidasa comercial

Muestra	HCN liberado (mg/100 g muestra)*
Almendra de capulín	135.76 \pm 3.992
Frijol del monte	180.96 \pm 9.782
Frijol Comba	9.79 \pm 3.992

*Valor promedio donde n=3

Posteriormente se hizo la misma determinación pero ahora se utilizó el preparado obtenido (F.P. III), en sustitución a la enzima comercial, bajo las siguientes condiciones:

[F.P.III]= 0.308 mg/ml

Buffer citrato-fosfato pH 5.0

Temperatura de incubación de 50 °C

Tiempo de hidrólisis por definir.

Al ser la primera vez en usar el preparado obtenido (F.P: III) en la cuantificación del HCN liberado, se desconocía el tiempo de hidrólisis necesario para liberar la misma cantidad de HCN que se desprende al utilizar la enzima comercial; por lo cual se decidió realizar el estudio de liberación de HCN a partir del glucósido cianogénico respectivo con relación al tiempo de hidrólisis, para cada una de las muestras a probar. Los resultados de este estudio lo tenemos resumido en las tablas 5.13, 5.14 y 5.15 y la representación gráfica en las figuras 5.14, 5.15 y 5.16.

Tabla 5.13. HCN liberado de glucósidos cianogénicos en almendra de capulín

Tiempo (min.)	HCN liberado (mg/100 g muestra)*
5	86.17±1.714
10	98.54±5.191
15	170.02±3.807
30	169.02±2.174
60	171.95±3.210

* Con valor promedio, mínimo por duplicado

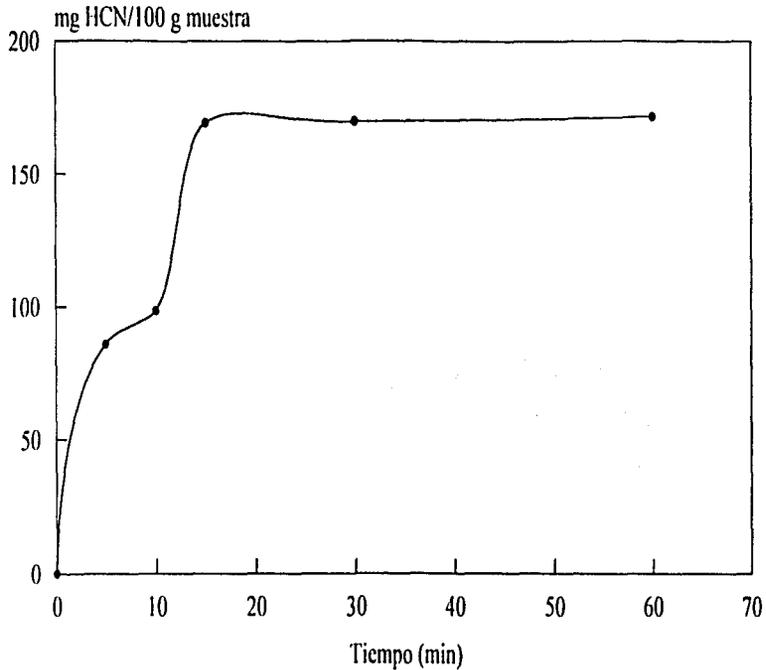


FIG5.14HCN LIBERADO EN ALMENDRA DE CAPULIN (*Prunus serotina*)

Tabla 5.14. HCN liberado de glucósidos cianogénicos del frijol monte

Tiempo (min.)	HCN liberado (mg/100 g muestra)
30	56.16±5.481
60	144.36±14.592
90	163.19±15.623
120	244.69±26.42
180	246.85±0.071
240	248.41±0.034

*Con valor promedio, mínimo por duplicado.

Tabla 5.15. HCN liberado de glucósidos cianogénicos de frijol comba

Tiempo (min.)	HCN liberado (mg/100 g muestra)
30	3.94±0.117
45	4.66±0.138
60	5.82±0.172
120	9.61±0.285
180	11.67±0.039
240	12.23±0.084

*Con un valor promedio, mínimo por duplicado.

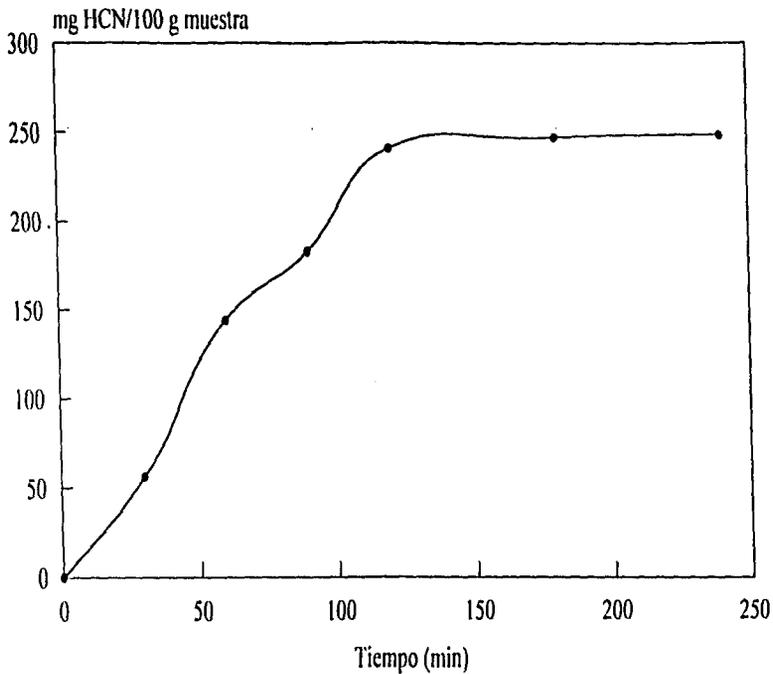


FIG 5.15 HCN LIBERADO EN FRIJOL MONTE (*Phaseolus lunatus*)

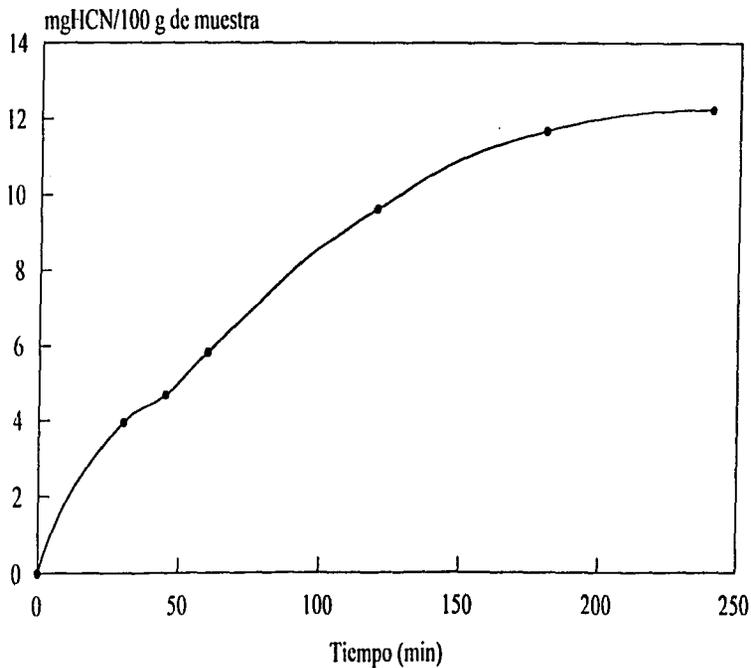


FIG 5.16 HCN LIBERADO EN FRIJOL COMBA (*Phaseolus lunatus*)

Para el caso de la almendra de capulín, como puede apreciarse en la gráfica 5.14 la liberación de HCN comienza a los 5 minutos, y a partir de aquí va aumentando conforme transcurre el tiempo hasta llegar a los 15 minutos, a partir de este tiempo y hasta los 60 minutos la curva se hace asintótica, por lo tanto al tiempo de 15 minutos se obtiene casi el valor máximo de HCN liberado para esta muestra.

Como la F.P. III fue obtenida de una planta procedente de la familia de las rosáceas, se supone que dicho extracto tiene una mayor afinidad por la amígdalina y por eso se decidió probar con dos muestras de *Phaseolus lunatus* que contienen linamarina como glucósido cianogénico. Ya que a tiempos cortos no se obtuvo una apreciable liberación de HCN, al no tener probablemente la misma afinidad por dicho sustrato; se comenzó a probar con tiempos más largos que para la anterior muestra, la gráfica 5.15, de mg de HCN vs tiempo, para el frijol monte, muestra como a partir de los 30 minutos ya se nota un desprendimiento de HCN; y continua hasta los 120 min., a partir de aquí y hasta los 240 min permanece constante prácticamente. Lo mismo sucede con el frijol comba, aunque no es tan pronunciada la tendencia asintótica. Por lo tanto al tiempo de 120 minutos se obtiene casi el valor máximo de HCN liberado para ambas muestras de *Phaseolus lunatus*

Para conocer si existe diferencia significativa estadísticamente entre la β -glucosidasa comercial y la F.P. III en la liberación de HCN de glucósidos cianogénicos, se aplicó la prueba t-student con 95% de confianza, encontrándose lo siguiente:

- Almendra de capulín sí existe diferencia significativa, a favor de la F.P. III.
- Frijol comba sí existe diferencia significativa a favor de la F.P. III.
- Frijol monte no existe diferencia significativa.

Lo anterior puede observarse de la presentación de barras de la figura 5.17 donde se compara la enzima comercial con la F.P. III.

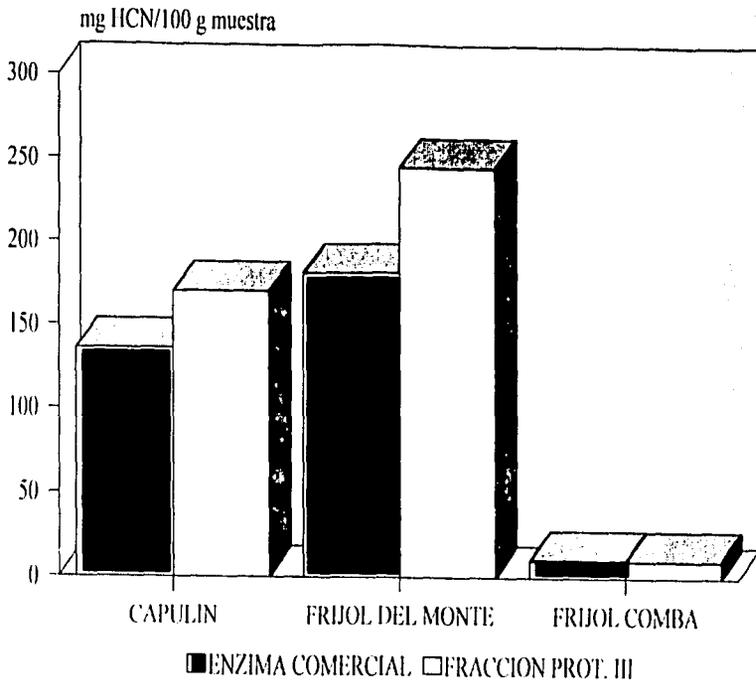


FIG.5.17 HCN LIBERADO APLICANDO LA METODOLOGIA DE INTERES

En la tabla 5.16 que a continuación se muestra, se presenta en forma breve las condiciones para la liberación de HCN a partir de glucósidos cianogénicos tanto para la enzima comercial como para el preparado obtenido en el presente trabajo (F:P:III).

Tabla 5.16. Comparación de enzima comercial con la F.P. III en la liberación de HCN

β -glucosidasa	Concentración de enzima (mg/ml)	Tiempo de incubación (min.)	Temperatura (°C)	pH
Comercial	1.0	240	40	7.0
F.P. III	0.308	Linamarina: 120 Atrnigdalina: 15	50	5.0

Para mostrar un panorama general de la purificación realizada se presenta el siguiente cuadro especificando el rendimiento de la misma.

	Proteína (%)	Actividad (U/mg muestra)	Actividad específica (U/mg proteína)	Rendimiento (%)
ALMENDRA INTEGRAL	34.0	0.432	1.30	100
HACD	61.0	0.810	1.33	85.22
F.P. I	67.10	0.790	1.81	67.73
F.P. II	72.53	0.56	2.73	39.78
F.P. III	68.0	1.56	7.65	13.88

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se aumentó la concentración de enzima β -glucosidasa para la cuantificación de unidades de actividad, por lo tanto se reestableció el tiempo óptimo de reacción, que fue de 5 minutos en donde además de mostrar una elevada actividad proporcionó un ahorro de tiempo sin afectar la adecuada manipulación.

Al extracto purificado obtenido se le establecieron las condiciones óptimas para la actividad enzimática donde destaca una temperatura relativamente elevada (50°C), lo que resulta una ventaja ya que con esto se reduce considerablemente el tiempo de hidrólisis de 45 minutos a 5 minutos. Se obtuvieron los parámetros cinéticos más importantes, donde la K_m fue aceptable puesto que nos indica una gran afinidad por el sustrato, así como el valor de V_{max} .

Comparando el extracto purificado con la enzima comercial en la determinación de glucósidos cianogénicos en muestras seleccionadas, se observaron varias ventajas: se redujo la concentración de enzima (de 10 mg/ml a 0.30 mg/ml) y el tiempo de hidrólisis (de 4 hr a 2 hr), la actividad mostrada por el extracto obtenido superó a la de la enzima comercial utilizada, resultó ser un método económico para la obtención de β -glucosidasa, además de ser aprovechado un fruto tan poco estudiado y de abundancia en nuestro país.

De acuerdo con lo anterior se pudo alcanzar el objetivo, de obtener un extracto enzimático estable con actividad de β -glucosidasa, que puede sustituir a la enzima comercial por medio de la cromatografía de afinidad a partir de la almendra de capulín.

CAPITULO VII
BIBLIOGRAFIA

1. Vallin, J., *BIOLOGIA*, Montaner y Simon, S.A., 2ª de., pag. 153-156, España (1979).
2. Hugh, P., *LOST CROPS OF THE INCAS*, National academic Press, Washington D.C. pp 223-227, (1989).
3. Martínez M., *CATALOGO DE NOMBRES VULGARES Y CIENTIFICOS DE PLANTAS MEXICANAS*, Fondo de Cultura Económica, 1ª edición pp. 156-157, México (1987).
4. Conn, E.E., Cyanogenic Glycosides, *J. Agr. Food Chem.*, 17 (3), 519-526 (1969).
5. Eyjolfsson, R., Recent advances in chemistry of cyanogenic glucosides, *Fortsch. Chem. Organ. Naturist.*, 28, 74-108 (1970).
6. Linder E., *TOXICOLOGIA DE ALIMENTOS*, Acribia S.A., 2ª edición, pp. 14-19, España (1995).
7. Liener I.E., *TOXIC CONSTITUENTS OF PLANT FOODSTUFFS*, pp. 143-157, N.Y. (1980).
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. Lehninger, A.L., *BIOQUIMICA*, Omega S.A ediciones, 4ª reimpresion., pag. 162-174, 148-158, Barcelona (1981)
10. Devlin, T.M., *BIOQUIMICA*, Reverté S.A., 2ª edición, pp. 148-156, Barcelona (1991).
11. Kuroki, G.W., Purification and characterization of cyanogen specific beta-glucosidases from mature *Prunus serotina* seeds, (tesis de doctorado), Colegio de graduados, University of Iowa, Iowa City, (1985).

12. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (eds.), Academic press, METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 1, pp 234-240, N.Y. (1955)
13. Whitaker, J.R., PRINCIPLES OF ENZYMOLOGY FOR THE FOOD SCIENCES, Marcel Dekker, Inc., pp 287-291, 319-320, N.Y. (1972).
14. López, M.A., Quintero, R.R., TECNOLOGIA ENZIMATICA, aplicaciones en alimentos y medicina, UNAM, pp 9-17, 61-78 y 117-126, México (1987)
15. 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).
16. Swain, E., Li, C.P. and Poulton, J.E., Prunus serotina Amygdalin hidrolase and Prunasin hidrolase, Plant Physiol., 100 (1), 282-290 (1992).
17. Gerhartz, Wolfgang., ENZYMES IN INDUSTRY, PRODUCTION AND APLICATIONS, Ed VCH, pp. 42-50, N.Y. (1990)
18. Martino, A., Pifferi, P.G., and Spagna, G., Production of β -glucosidase by *Aspergillus niger* using carbon sources derived from agricultural wastes, J. Chem. Tech. Biotechnol., 60, 247-252 (1994)
19. Ayhlón, M.F., Obtención de un extracto enzimático con actividad de beta-glucosidasa a partir de semillas de capulín (*Prunus serotina*), (tesis de licenciatura), Fac. de Química UNAM, México (1995).
20. Bauer, J.D., ANALISIS CLINICOS: METODOS E INTERPRETACION, Ed Reverté S.A., pag 518,519, Barcelona (1986).
21. Hartree, E.F., Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response, Anal. Biochem., 48, 422-427 (1972)
22. 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)
23. Swain, E., Ping, Ch.L., and Poulton, J.E., Development of the Potential for Cyanogenesis in Maturing Black Cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) Fruits, Plant Physiol., 98, pp. 1423-1428, (1991).