



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE
FOSFATO INORGÁNICO (Pi) SOBRE ALGUNOS DE LOS
COMPONENTES DE SEMILLAS DE FRIJOL
(*Phaseolus vulgaris L.*) VARIEDAD CANARIO 60**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO**

PRESENTA

RICARDO LÓPEZ DE JESÚS



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: MARIA ELSA ESCUDERO GARCÍA

VOCAL: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

SECRETARIO: ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS

1ER. SUPLENTE: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

2DO.SUPLENTE: NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA

Sitio donde se desarrollo el tema: Laboratorio 102, edificio “E”, departamento de Bioquímica, Facultad de Química UNAM.

Dr. Eleazar Martínez Barajas
Asesor del tema

M. en C. Lilia Angélica Bernal Gracida
Supervisor técnico

Ricardo López de Jesús
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue elaborado en el laboratorio 102 del edificio E de la facultad de química.

- Un profundo agradecimiento a mi familia que supieron siempre comprender y apoyar la dedicación a este trabajo.
- A mi tutor Eleazar Martínez Barajas por sus consejos y el apoyo siempre demostrado.
- A los compañeros y amigos que siempre estuvieron en el momento oportuno.
- A los honorables miembros del jurado por la revisión del manuscrito de tesis y sus valiosas sugerencias.
- A todas las personas que en diversas formas colaboraron en este trabajo.

RECONOCIMIENTO

Esta tesis forma parte del proyecto DGAPA-PAPIIT IN207 907 (Generación de EST's que participan en el desarrollo de la semilla de frijol y cuya expresión se modifica en respuesta a la deficiencia de fosfato).

ÍNDICE GENERAL

1.0	Introducción.	4
1.1	Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>).	4
1.2	Deficiencia de fósforo en cultivos.	4
1.3	Almidón.	5
1.4	Gránulo de almidón.	5
1.5	Fuentes de almidón.	6
1.6	Cambios en las características del almidón inducidas por condiciones ambientales desfavorables.	6
1.7	Modificaciones químicas del almidón.	7
1.7.1	Almidón acetilado.	7
1.7.2	Almidón oxidado.	8
1.7.3	Almidón hidroxilado y eterificado.	8
1.7.4	Almidón fosforilado.	9
1.8	Almidón resistente.	9
2.0	Hipótesis y objetivos.	11
3.0	Diseño experimental.	12
4.0	Materiales y métodos.	13
4.1	Material biológico.	13
4.2	Equipos y reactivos.	13
4.3	Desinfección de las semillas.	13
4.4	Condiciones del cultivo de frijol.	13
4.5	Conteo de flores y vainas.	14

4.6	Análisis de producción de biomasa. 14
4.7	Obtención de la harina total de semilla de frijol. 14
4.8	Purificación del almidón a partir de la harina de semillas de frijol. 14
4.9	Efecto de la falta de Pi sobre las características de la harina de las semillas de frijol. 15
4.9.1	Cuantificación de Pi en harina de frijol. 15
4.9.2	Cuantificación de proteína soluble. 15
4.9.3	Cuantificación de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y almidón. 16
4.9.4	Cuantificación de glucosa. 16
4.9.5	Cuantificación de fructosa. 17
4.9.6	Cuantificación de sacarosa. 17
4.9.7	Cuantificación de almidón. 17
4.10	Efecto de la falta de Pi sobre las características de las proteínas presentes en la harina de las semillas de frijol. 18
4.10.1	Electroforesis SDS-PAGE para el estudio de proteínas totales y glicosiladas. 18
4.10.2	Tinción de proteínas totales. 18
4.10.3	Tinción de proteínas glicosiladas. 18
4.11	Efecto de la falta de Pi sobre las características del almidón de las semillas de frijol. 19
4.11.1	Evaluación de gránulos de almidón por microscopía electrónica de barrido. 19
4.11.2	Cuantificación de Pi en almidón. 19
4.11.3	Determinación de amilosa y amilopectina. 19
4.11.4	Degradación enzimática del almidón. 21

5.0	Resultados.	22
5.1	Estudio del efecto de la deficiencia de Pi sobre la producción de biomasa en plantas de frijol.	22
5.1.1	Determinación de biomasa.	22
5.2	Estudio del efectos de la deficiencia de Pi sobre las características de las semillas de frijol.	24
5.3	Análisis del efecto de la deficiencia de Pi sobre Las características de las proteínas solubles.	26
5.4	Estudio del efecto de deficiencia de Pi sobre el tamaño de los gránulos de almidón	27
5.5	Análisis de los efectos de la deficiencia de Pi sobre el contenido y las propiedades del almidón.	28
5.6	Degradación de almidón de semilla de frijol por ensayo enzimático.	30
6.0	Discusión.	31
7.0	Conclusiones.	33
8.0	Apéndices.	34
8.1	Apéndice 1 (Preparación de reactivos).	34
8.2	Apéndice 2 (Técnicas y métodos).	38
9.0	Bibliografía.	40

1.0 Introducción

1.1 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Dentro del grupo de las especies leguminosas, el frijol común es una de las más importantes. Es una planta anual, herbácea intensamente cultivada desde la zona tropical hasta las templadas. Es originario de América y se le conoce con diferentes nombres: poroto, haricot, caraota, judía, aluvia, habichuela y otros.

El frijol es uno de los alimentos básicos en la dieta del mexicano y es la principal fuente de proteína; es rico en lisina pero deficiente en los aminoácidos azufrados metionina, cistina y triptófano; por lo cual una dieta adecuada en aminoácidos esenciales se logra al combinar frijol con cereales (arroz, maíz, otros).⁹

1.2 Deficiencia de fósforo en cultivos.

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para todos los seres vivos; es parte de estructuras biológicas, participa en muchos procesos celulares y su ausencia repercute negativamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La mayor parte del P del suelo está en compuestos orgánicos e inorgánicos no asimilables. Las plantas sólo pueden tomar ortofosfato (P_i , H_2PO_4), cuya concentración rara vez excede $10 \mu M$.² De las áreas agrícolas de Latinoamérica y África, el 50% presentan niveles bajos de P_i , por lo cual, es frecuente que los cultivos sufran algún grado de deficiencia. La falta de P reduce el crecimiento de la parte aérea, las hojas son más pequeñas, su color más intenso, y se acumula glucosa, fructosa, sacarosa y almidón en hojas y raíces. En el caso particular de frijol, se ha observado que la carencia de P promueve cambios a diferentes niveles: se incrementa la movilización y uso del P_i almacenado en la vacuola, las raíces cambian su estructura y aumenta la densidad y longitud de las raíces laterales, raíces adventicias y pelos radicales¹³. Se induce la expresión de transportadores de P_i de alta afinidad y se estimula la producción y secreción de ácidos orgánicos (cítrico y málico) y enzimas (fosfatasa y ARNasas). Dada la escasa disponibilidad de P_i asimilable, hay plantas que han desarrollado la capacidad de producir más biomasa en función del P_i disponible y en condiciones en donde este es limitante, a esto se le conoce como eficiencia al P_i .²

1.3 Almidón.

El almidón es el carbohidrato de reserva dominante en plantas superiores, se encuentra en hojas con cloroplastos y en amiloplastos de órganos de almacén como las semillas y los tubérculos. El almidón está compuesto por dos tipos de macromoléculas, amilosa y amilopectina, la amilosa es esencialmente una molécula lineal con un peso molecular que va de 5×10^5 a 10^6 kD y está formada de unidades de anhidroglucosa enlazados a través de uniones α (1,4). Por otro lado la amilopectina también tiene un peso molecular de varios millones, es un polímero que además de los enlaces α (1,4) tiene de 2-4% de enlaces α (1,6). Aún cuando existen diferencias entre especies, los contenidos promedio en semillas de amilosa y amilopectina son del 30% y 70% respectivamente.²⁴

La biosíntesis del almidón en los órganos de reserva es un proceso complejo que inicia cuando en el citosol la sacarosa proveniente de la fotosíntesis es convertida a glucosa uridin difosfato (UDP-glucosa) y en fructosa por la sacarosa sintasa. Después la UDP-glucosa pirofosforilasa transforma a la UDP-glucosa en glucosa 1-fosfato (glu1-P) para lo cual se requiere pirofosfato (PPi); posteriormente, la fosfoglucomutasa convierte a la glu1-P en glucosa 6-fosfato (glu6-P) que es transportada al interior de los amiloplastos mediante translocadores específicos. Ya dentro del amiloplasto, la fosfoglucomutasa cataliza la reacción inversa y nuevamente genera glu1-P, la cual es usada por la ADP-glu pirofosforilasa para generar ADP-glu que las almidón sintetasas utilizan para llevar a cabo la biosíntesis de amilosa y amilopectina.²¹

En cereales se tiene evidencia de que la síntesis de ADP-glu también puede ocurrir en el citoplasma y que mediante transportadores específicos puede ser introducida a los amiloplastos en donde es utilizada en la síntesis de almidón.¹⁹

1.4 Gránulo de almidón.

Las moléculas de amilosa y amilopectina se organizan y forman gránulos insolubles de diferentes formas y tamaños, cuyas dimensiones y características varían entre especies. Los gránulos de tubérculos de papa miden 100 μm , mientras que los de hoja de *A. thaliana* solo miden de 1-3 μm . Algunos gránulos tienen forma esférica o son esferoides aplanados con un surco ecuatorial y hay otros que son poligonales. Las diferencias en el contenido de amilosa y la amilopectina modifican la capacidad de los gránulos para asociarse

con otras moléculas. La amilosa se asocia con moléculas hidrófobas pequeñas, por lo que es común que esta fracción contenga una proporción alta de lípidos. La amilopectina contiene grupos fosfatos unidos como monoésteres en las posiciones C-3 y C-6 de la glucosa. Si bien la proporción de moléculas fosforiladas es muy pequeña (< 0.5 %), es muy importante para definir las características del empaquetamiento de las dobles hélices, el ordenamiento del gránulo y la interacción con proteínas que participan en su degradación.³

1.5 Fuentes de almidón.

Los almidones más ampliamente utilizados en la industria de alimentos provienen de un pequeño número de especies de cultivos: maíz, papa, trigo y tapioca. Los de arroz y sorgo también se usan, aunque en menor proporción. Los almidones de tapioca y sorgo son utilizados casi exclusivamente como alimentos, mientras que los de maíz, papa y trigo además del área de alimentos tienen usos adicionales.²¹

En el caso particular del almidón de maíz, es difícil eliminar las proteínas y lípidos que se asocian a la superficie de los gránulos y dado que esos elementos pueden modificar las propiedades funcionales del almidón, con frecuencia los almidones de trigo y papa se usan como sustitutos del almidón de maíz. Sin embargo, los almidones de trigo, contienen dos poblaciones de diferente tamaño de gránulos (A y B), lo que dificulta su purificación y afecta sus propiedades funcionales. El almidón de papa posee bajos niveles de lípidos, lo que le confiere propiedades funcionales superiores a las del almidón de trigo.²¹

1.6 Cambios en las características del almidón inducidas por condiciones ambientales desfavorables.

Se ha encontrado que las condiciones de cultivo pueden modificar las características del almidón. En el caso particular del trigo, si el cultivo es sometido a un estrés hídrico aumenta el contenido de amilosa, el grado de fosforilación, el contenido de lípidos asociados al almidón y se amplía la distribución de tamaño de los gránulos. Todos estos cambios dan como resultado una mala calidad del grano de trigo para la elaboración de pastas.¹⁷

El estrés por calor es otro factor que afecta el rendimiento y calidad del trigo en muchos países. Temperaturas cercanas a los 40 °C reducen la acumulación de almidón y proteína en el endospermo. Se ha observado que enzimas clave en la síntesis de almidón como la

sacarosa sintasa (SuSy), la almidón sintasa soluble (SSS) y la almidón sintasa ligada a los gránulos de almidón (GBSS), son inhibidas por el calor y de aquí que el rendimiento de almidón y sus características se vean afectadas.²⁵

1.7 Modificaciones químicas del almidón.

En su estado nativo los almidones tienen propiedades espesantes y gelificantes que regulan y estabilizan la textura de los alimentos; sin embargo, las propiedades de los almidones pueden ser modificadas por las condiciones extremas que con frecuencia se usan en la elaboración de los alimentos (ej.: temperatura, pH y presión), como consecuencia, las propiedades del almidón cambian y se observa que disminuye la resistencia al corte, alto nivel de retrogradación (insolubilización y precipitación espontánea de las moléculas de amilosa) y la sinéresis (gelación). Estos cambios limitan las aplicaciones industriales. Se ha descubierto que la estructura nativa de los almidones se puede modificar por métodos químicos, físicos y enzimáticos, dando origen a numerosos derivados, los cuales pueden ampliar sus posibilidades de aplicación. La modificación química es el método más comúnmente usado, como resultado, los almidones modificados generalmente muestran mejor claridad y estabilidad de pasta, menor tendencia a la retrogradación y aumento en la estabilidad al congelamiento-descongelamiento. Aunque el proceso de modificación a nivel industrial es en la actualidad ampliamente utilizado, las bases moleculares de los cambios no se conocen completamente.¹⁶

1.7.1 Almidón acetilado.

El almidón acetilado se obtiene por esterificación con anhídrido acético, el número de grupos acetilo incorporados en la molécula depende de la fuente del almidón, concentración del reactivo, tiempo de reacción, proporción de amilosa / amilopectina, pH, y la presencia de un catalizador. El almidón altamente acetilado es soluble en cloroformo y acetona, adquiere propiedades termoplásticas y puede ser usado como aglutinante en la elaboración de tabletas, recubridor, filtros para cigarrillos, materiales de empaque biodegradables, entre otras aplicaciones.⁶

La acetilación del almidón también facilita la hidratación del granulo lo cual provoca que la degradación de este sea mas fácil, ya que esta modificación afecta los complejos de amilosa-lípidos que obstaculizan la degradación enzimática.⁸

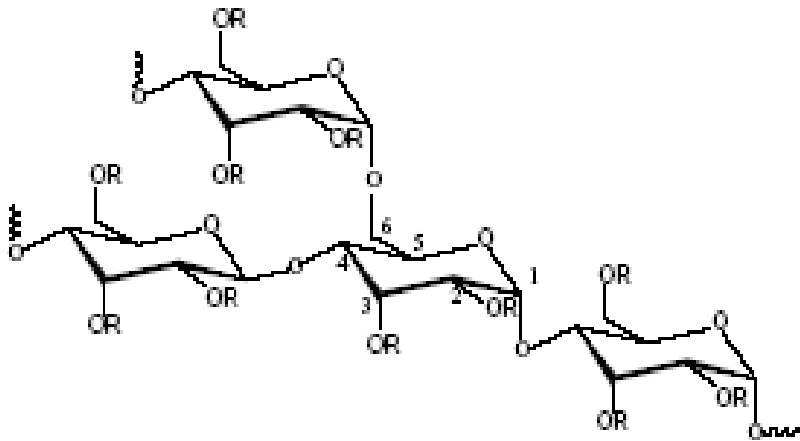


Figura I.- Estructura de almidón acetilado

1.7.2 Almidón oxidado.

El almidón oxidado es producido por la reacción del almidón con una cantidad específica del reactivo oxidante (generalmente hipoclorito de sodio) a temperatura y pH controlados. La oxidación del almidón implica la introducción de grupos carbonilo y carboxilo en las unidades de glucosa, dentro de la matriz del polímero. Los grupos hidroxilos en las moléculas de almidón son oxidados primero a grupos carbonilo y luego a grupos carboxilo, y su número indica el nivel de oxidación. Esta modificación blanquea el almidón y disminuye la retrogradación.¹⁴

1.7.3 Almidón hidroxilado y eterificado.

La eterificación e hidroxilación del almidón incrementa la capacidad para retener agua, lo cual provoca cambios en la gelatinización del almidón y en las propiedades de la pasta; además al disminuir el efecto de retrogradación, contribuye a mejorar su uso en la industria de alimentos.¹⁵

1.7.4 Almidón fosforilado.

De manera natural el almidón está parcialmente fosforilado en las posiciones de C3 y C6 de la glucosa³. La fosforilación es llevada a cabo por las enzimas GWD (glucan agua dicinasa) y PDW (fosfoglucon agua dicinasa). No se conoce con claridad la función biológica de la fosforilación del almidón, sin embargo, es parte integral del proceso de biosíntesis y fundamental para que la degradación sea eficiente.¹⁰ Los almidones fosforilados forman geles mas viscosos y transparentes, por lo que el almidón de papa se utiliza preferentemente como un ingrediente en la elaboración de pastas. Sin embargo, el grado de fosforilación puede cambiar significativamente de acuerdo al cultivo y factores ambientales.¹¹

Los almidones fosforilados por métodos químicos normalmente se preparan haciendo reaccionar almidón seco con tripolifosfato de sodio u ortofosfato de sodio a altas temperaturas (150-160°C). Si el pH es menor a 7 se producen fosforilaciones monoéster y si el pH se fija en un intervalo de 8 - 10 la reacción aumenta el rendimiento de fosforilaciones diéster. Este tipo de almidones forman pastas claras, de alta consistencia y de buena estabilidad cuando se someten a ciclos de congelación-descongelación, de allí que también se les use para estabilizar la fermentación de productos lácteos y los helados así como para impartir retención de agua en quesos, surimi y productos cárnicos.¹⁸

1.8 Almidón resistente.

El almidón es uno de los componentes principales de la dieta humana y hasta hace algunos años se consideraba que era completamente digerido y absorbido en el intestino delgado de los humanos, sin embargo hay una fracción de almidón que es resistente a la degradación enzimática, a la que se le denomina almidón resistente (AR) y que de acuerdo con la EURESTA (*European Research Project on Resistant Starch*) se define como la fracción de almidón (o los productos de su degradación) que son resistentes a la digestión en el intestino delgado de gente saludable.²²

El AR sigue su tránsito por el intestino delgado y llega al intestino grueso, donde es fermentado por las bacterias de la flora normal del colon, las cuales generan ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como acetato, butirato y propionato.

Los AGCC producto de la fermentación del AR son benéficos en la salud, pues reducen las respuestas glucémicas e insulinémicas al alimento, son hipocolesterolémicos y protegen contra el cáncer colo-rectal. La clasificación del AR se basa fundamentalmente en las características estructurales del almidón. El AR1 corresponde a almidón físicamente inaccesible, atrapado en la matriz celular, tal como sucede en las leguminosas. El AR2 son los gránulos nativos, que no han sido sometidos al proceso de cocción y conservan su estructura cristalina que los hace menos susceptibles a la hidrólisis. El AR3 es el almidón retrogradado, el cual se forma en los alimentos que durante su elaboración fueron calentados a alta temperatura, pues la amilosa al enfriarse se reasocia y forma estructuras semicristalinas resistentes a la hidrólisis enzimática.²⁰

Las leguminosas procesadas contienen cantidades significativas de AR1, AR2 y AR3, lo que las hace particularmente interesantes.²²

En la siguiente tabla se muestran otros efectos fisiológicos benéficos que tiene el almidón resistente en el hombre.¹²

EFFECTOS FISIOLÓGICOS DEL ALMIDÓN RESISTENTE ¹²	
POTENCIAL EFECTO FISIOLÓGICO	CONDICIONES DONDE PUEDE HABER UN EFECTO PROTECTOR
Mejora las respuestas glicemicas e insulinemicas	Diabetes, respuestas deterioradas de insulina y glucosa.
Mejora la salud del intestino	Cáncer del colon rectal, colitis ulcerosa, enfermedades inflamatorias del intestino, diverticulitis, constipación.
Mejora el perfil de lípidos en la sangre	Enfermedades cardiovasculares, metabolismo de lípidos, síndrome metabólico.
Interacciones de sinergismo con otros componentes de la dieta; ejemplo fibras, proteínas y lípidos	Mejora el control metabólico e incrementa la salud del intestino
Termogénesis	Obesidad, diabetes
Aumento en la absorción de micronutrientes	Incremento en la absorción de minerales, osteoporosis.

2.0 Hipótesis y objetivo.

Hipótesis.

En la mayor parte de los suelos dedicados a la agricultura el fósforo, que es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas se encuentra formando complejos que las plantas no pueden aprovechar. Se ha observado que diversas condiciones ambientales que reducen el rendimiento, también modifican las características de los componentes de las semillas y son responsables de alterar la calidad de los productos que se elaboran con ellas. Se propone que las plantas de frijol cultivadas en deficiencia de fósforo producirán semillas donde el contenido y las características de las proteínas y el almidón, serán alteradas.

Objetivos.

- Investigar que cambios induce la deficiencia de fósforo sobre las características de las proteínas y del almidón que acumulan las semillas.
- Investigar si estas modificaciones afectan la susceptibilidad del almidón a la hidrólisis enzimática.

3.0 Diseño experimental.

Plantas de frijol variedad canario 60 se regaron con solución Hoagland complementada con 500 y 100 μM de Pi (*ver apéndice N^o1*), las cuales permiten el desarrollo adecuado o que las plantas manifiesten los síntomas de deficiencia de Pi.

Una vez que las plantas entraron a la etapa reproductiva, se contaron flores y posteriormente las vainas, a estas últimas también se les midió la longitud. Al término del ciclo, se obtuvo el peso seco de la parte aérea y el de raíces. Las semillas producidas por cada planta también se contaron y pesaron.

Parte de las semillas producidas en las dos condiciones se molieron en un mortero y la harina se usó para definir el efecto de la deficiencia de Pi sobre el contenido de Pi en harina, de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa), proteínas totales y contenido de almidón. También se hicieron geles de poliacrilamida (SDS PAGE) con los cuales se investigó si la falta de Pi modifica la cantidad y el patrón de glicosilación de las proteínas.

Por último, se purificó almidón a partir de la harina de frijol, el cual se analizó por microscopia electrónica de barrido. También se cuantificó su contenido de Pi, porcentaje de amilosa y amilopectina; así como la susceptibilidad de los gránulos a la hidrólisis enzimática.

4.0 Materiales y Métodos.

4.1 Material biológico.

Para la realización de las investigaciones que se reportan en este trabajo, se utilizaron semillas de frijol de la variedad Canario 60.

4.2 Equipo.

Se usaron los siguientes equipos: vórtex y horno de la marca ADEA. Las micropipetas de marca RAININ Instrument Co; la centrífuga de velocidad media y la microcentrifuga, ambas de marca Sorvall-Dupont; los aparatos de electroforesis vertical y las fuentes de poder de marca GIBCO-BRL life technologies, espectrofotómetro de la marca Pharmacia LKB ultrospec III y Microscopio Electrónico de Barrido Marca HITACHI Mod. S-500 con 20.0 KV de voltaje de aceleración

4.3 Desinfección del material biológico.

Para desinfectar las semillas, se sumergieron en etanol al 70% por 1 minuto, se enjuagaron tres veces con agua desionizada y en seguida se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos. Finalmente, se enjuagaron cuatro veces con agua desionizada.

4.4 Condiciones del cultivo de frijol.

Las semillas de frijol desinfectadas se pusieron a germinar sobre un algodón húmedo a 25 °C. Una vez que brotaron las raíces, las plántulas fueron transplantadas a una maceta con agrolita y se dividieron en dos grupos. A partir de ese momento cada grupo fue regado con solución nutritiva Hoagland (*ver apéndice N^o1*) que contenía diferente cantidad de fosfato inorgánico, 100 µM para las plantas sometidas a condiciones de deficiencia y 500 µM, concentración a la cual las plantas crecen adecuadamente.

Las plantas se regaron todos los días y los riegos con solución nutritiva se alternaron con riegos con agua desionizada. Las plantas fueron cultivadas bajo condiciones de invernadero con ciclos de 26 °C durante el día y 15 °C durante la noche. La humedad relativa se mantuvo a 70%, hasta que completaron su ciclo biológico (aproximadamente 60 días).

4.5 Conteo de flores y vainas.

Una vez que las plantas llegaron a su etapa de reproducción se llevó a cabo el conteo de flores y de vainas cada tercer día.

4.6 Análisis de producción de biomasa.

Se colectaron y secaron las hojas producidas por las plantas a lo largo de su ciclo biológico, y al final del mismo se registró el peso seco de las raíces. El peso seco de las vainas y de las semillas producidas por cada planta también fue considerado.

4.7 Obtención de harina total de semilla de frijol.

Las semillas se molieron en un mortero hasta obtener un polvo fino y uniforme, que se tamizó en una malla # 80.

4.8 Purificación de almidón a partir de harina de semillas de frijol.

Para purificar almidón se suspendieron 3g de harina total en 20 mL de una solución amortiguadora que contenía Tris-HCl 100 mM pH 7, EDTA 5 mM y etilenglicol 10% (v/v). Se filtró por una malla para remover el material grueso. Lo que no logró pasar se resuspendió en 10 mL de la misma solución amortiguadora y se volvió a filtrar. La mezcla filtrada se centrifugó a 3000 g por 10 minutos. El sobrenadante se decantó y el precipitado se resuspendió en 30 mL del mismo amortiguador complementado con SDS al 0.5% (p/v). La nueva mezcla se centrifugó 10 minutos a 3000 g. Esta operación se repitió dos veces más. Por último la pastilla se resuspendió en 30 mL de agua desionizada y se centrifugó a 3500 g por 10 minutos. Este paso que tiene la finalidad de eliminar el SDS se repitió 4 veces. Como punto final, el almidón purificado se lavó con acetona.

4.9 Efecto de la falta de Pi sobre las características de la harina de las semillas de frijol.

4.9.1 Cuantificación de Pi en harina de frijol.

La medición del fosfato inorgánico (Pi) se llevó a cabo en tubos de ensaye que habían sido lavados con detergente libre de Pi. Las muestras se analizaron por triplicado y en cada tubo se colocaron de 2-3 mg de harina total. A cada tubo se le adicionaron 20 μL de una solución de nitrato de magnesio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) al 10% (p/v) preparado en etanol al 95%. El contenido de cada tubo se calcinó hasta obtener cenizas blancas. Una vez que se consiguió esto, se agregaron 300 μL de HCl 0.5N. Los tubos se taparon con canicas y se colocaron en baño María a temperatura de ebullición durante 15 minutos. Por último se adicionaron 700 μL de una solución que contenía 1 parte de ácido ascórbico al 10 % y 6 partes de molibdato de amonio $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 0.42% en H_2SO_4 1N. Se mezcló agitando en el vórtex, se incubó durante 20 minutos a 45°C y se midió la absorbancia a 820nm. El contenido de Pi se calcula a partir de una curva patrón de Pi utilizando diferentes cantidades de una solución fosfato de potasio (KH_2PO_4) 1mM.

4.9.2 Cuantificación de proteína soluble.

La cuantificación de proteína soluble presente en la harina total se llevó a cabo mediante el método Bradford⁵. Se pesaron por triplicado 10 mg de la harina total, se pusieron en tubos eppendorf y se les agregó 1 mL de agua destilada. Se mezcló agitando en el vórtex y luego de centrifugar a 500 g, del sobrenadante se tomaron 20 μL que se colocaron en otro tubo eppendorf, se agregaron 80 μL de agua destilada y se mezcló en el vórtex.

Para cuantificar la proteína presente en las muestras, se elaboró una curva patrón utilizando 0, 10, 20, 30, 40, 50, 75 y 100 μL de un stock de albúmina sérica bovina de concentración 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. El volumen se ajustó a 100 μL con agua destilada y se agregaron 1.5 mL de solución Bradford (*ver apéndice N^o1*). Se mezcló por inversión y pasados 10 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm.

4.9.3 Cuantificación de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y almidón.

Para esta prueba se pusieron en un tubo eppendorf 50 mg de harina. Se añadieron 250 μ L de etanol al 80 % y se calentó durante 15 minutos a 80 °C. Luego se centrifugó a 3000 g y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio. La pastilla se resuspendió en otros 250 μ L de etanol 80% y se repitió la extracción. Los sobrenadantes se combinaron y se usaron para medir glucosa, fructosa y sacarosa presentes en la harina. La pastilla se hidrolizó para medir el almidón presente.

4.9.4 Cuantificación de glucosa.

Primeramente se procedió a construir una curva patrón, para lo cual se colocaron en celdas de plástico los volúmenes que se indican en la tabla de abajo.

N° de celda	μ L de glucosa 5mM	μ L de mezcla de reacción	μ L de agua destilada
0	0	300	675
1	10	300	665
2	20	300	655
3	30	300	645
4	40	300	635
5	50	300	625

NOTA: La mezcla de reacción contiene 250 μ L Buffer 4X (TRIS-HCl 100 mM y KCl 400 mM) pH 8, 50 μ L de ATP 20 mM, 625 μ L de H₂O, 0.13 mg de NAD y 1U/mL de Hexocinasa.

Luego se leyeron en el espectrofotómetro a 340 nm, el valor de esta absorbancia (Abs_1) se anotó y seguido de esto se agregó 1 U de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (disuelta en 25 μ L de solución amortiguadora 4X pH 8). Las celdas se mezclaron por inversión y se dejaron reposar por 15 minutos. Después de esto se volvió a leer y se registró el segundo valor de la absorbancia (Abs_2). Una vez que se estableció una relación lineal entre las concentraciones de glucosa y sus absorbancias, se realizaron pruebas para determinar que volumen de extracto etanólico debería usarse para que las lecturas de absorbancia se encontraran dentro de los límites definidos por la curva patrón. Ya que se concluyeron dichas pruebas, para la cuantificación de la glucosa presente en la harina total se utilizaron 75 μ L de los extractos etanólicos previamente preparados. El valor de la

diferencia entre las absorbancias 2 (Abs_2) y 1 (Abs_1) se interpoló en la curva patrón de glucosa.

4.9.5 Cuantificación de fructosa.

Para medir la cantidad de fructosa presente en las muestras, después de agregar la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y de registrar la lectura correspondiente, se agregó 1 U de la enzima fosfo-glucosa isomerasa (disuelta en 25 μ L de solución amortiguadora 4X pH 8). Se mezcló y después de 20 minutos se registró una tercera lectura de absorbancia (Abs_3). La cantidad de fructosa se obtuvo interpolando en la curva patrón de glucosa el valor de la diferencia entre la absorbancia 3 (Abs_3) y la absorbancia 2 (Abs_2).

4.9.6 Cuantificación de sacarosa.

Para evaluar la cantidad de sacarosa presente en la harina, se usaron 20 μ L de la fracción soluble en etanol al 80%. La curva patrón se preparó adicionando 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μ L de un stock de sacarosa 2.5 mM. El volumen de las muestras se llevó a 100 μ L con agua destilada y a cada uno, se le agregaron 50 μ L de KOH al 30%. Los tubos se calentaron 15 minutos a 80 °C y ya fríos se les adicionaron 2 mL de la solución de antrona (150 mg de antrona por cada 100 mL de H_2SO_4 al 70%), se agitó en el vórtex y después de 10 minutos se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm.

4.9.7 Cuantificación de almidón.

La cuantificación del almidón presente en la harina se basa en que éste no es soluble en etanol al 80%, por lo que una vez removidos los azúcares solubles, se hidroliza y se determina la cantidad de glucosa. Para esto, la pastilla insoluble en etanol al 80% se resuspendió en 500 μ L de agua destilada y se calentó por 3 horas a 80 °C. Se dejó enfriar y se añadieron 500 μ L de una solución que contenía amiloglucosidasa (6 mg de amiloglucosidasa, en 1.2 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio pH 4.5 0.5M) y se incubó a 50 °C por un tiempo de 12 horas. Al concluir este tiempo se centrifugó por 5 minutos a 10 000 g, el sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf y se determinó la cantidad de glucosa por el método antes mencionado.

4.10 Efecto de la falta de Pi sobre las características de las proteínas presentes en la harina de las semillas de frijol.

4.10.1 Electroforesis SDS-PAGE para el estudio de proteínas totales y glicosiladas.

Luego de haber pesado 10 mg de harina, se adicionó 1 mL de agua destilada y se mezcló en vórtex. Se centrifugó a 11000 g por 5 minutos y se midió la proteína presente en el sobrenadante. Se separaron 10 µg de proteína y el volumen se ajustó a 22.5 µL con agua destilada. Se adicionaron 7.5 µL de buffer de muestra (*ver apéndice 1*), se agitó en vórtex y se calentó en baño María a temperatura de 60 °C por 10 minutos. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) (*ver apéndice N°2*). Los pozos se cargaron con el volumen equivalente a 10 µg de proteína y como marcadores se utilizó una mezcla de proteínas de 97, 66, 45, 30, 20.1 y 14.4 kDa. La separación se hizo aplicando una corriente de 100 mA.

4.10.2 Tinción de proteínas totales.

Para visualizar las proteínas totales, el gel se incubó por 4 horas con agitación en una solución de azul de Coomassie (*ver apéndice N°1*) y se destiñó en una solución de metanol y ácido acético al 50 y 3%, respectivamente. Por último el gel fue deshidratado y fotografiado.

4.10.3 Tinción de proteínas glicosiladas.

Para teñir a las proteínas glicosiladas se usó el kit comercial *Gel CODE Glycoprotein Staining* (*Pierce biotechnology perbio*). Primeramente el gel se incubó con agitación moderada por 30 minutos en 100 mL de metanol al 50%. Concluido ese tiempo se hicieron dos lavados de 10 minutos cada uno con 100 mL de ácido acético al 3%. Luego el gel se transfirió a un recipiente que contenía 20 mL de una solución oxidante (ácido periódico) donde se dejó en agitación por 15 minutos. Después se hizo otro lavado de 5 minutos con 20 mL de ácido acético al 3%. Esta operación fue repetida dos veces más. Posteriormente el gel fue transferido a otro recipiente con 20 mL de la solución *Gel Gel CODE Glycoprotein Staining* en donde con agitación suave permaneció por 10 minutos antes de pasar a otro recipiente con 20 mL de una solución reductora (metabisulfito de sodio) en la que permaneció 5 minutos. Para finalizar el gel se lavó seis veces con ácido acético al 3%

y luego con agua destilada. Siguiendo este procedimiento las proteínas glicosiladas forman bandas de color magenta.

4.11 Efecto de la falta de Pi sobre las características del almidón de las semillas de frijol.

4.11.1 Evaluación de gránulos de almidón por microscopía electrónica de barrido.

Una vez que se contó con el almidón purificado lo que se procedió a realizar fue tomar muestras de cada grupo de almidón y se llevaron a examinar por microscopía electrónica de barrido, esto nos ayudaría por un lado a observar si la purificación había sido adecuada y por otro a establecer si la falta de Pi había modificado la distribución del tamaño de los gránulos de almidón.

4.11.2 Cuantificación de fosfato inorgánico presente en el almidón.

Para la cuantificación del fosfato inorgánico (Pi) presente en el almidón, se utilizaron alrededor de 2-3 mg del almidón purificado. El procedimiento empleado es el mismo que se usó para la medición de los niveles de Pi de la harina total.

4.11.3 Determinación de amilosa y amilopectina.

En el método empleado se utiliza la precipitación diferencial de la amilopectina con Concanavalina A (Con A), así como la hidrólisis del almidón total y de la fracción correspondiente a la amilopectina. Posteriormente se cuantifica la glucosa presente en cada fracción y el contenido de amilopectina se obtiene por diferencia.

Pre-tratamiento del almidón (eliminación de lípidos).

Para la determinación de amilosa y amilopectina se usó un kit comercial de la compañía Megazyme (Measurement of amylose/ amylopectin). En tubos de ensayo de 10 mL se colocaron muestras de 20-25 mg de almidón y 1 mL de DMSO. Los tubos se agitaron suavemente en el vórtex, luego se taparon y se colocaron en baño María a temperatura de ebullición del agua por 1 minuto. Después los tubos se agitaron vigorosamente en el vórtex y

se colocaron en baño María a ebullición por 15 minutos con agitaciones vigorosas ocasionales. Transcurrido ese tiempo y luego de que los tubos estuvieron a temperatura ambiente, se añadieron 2 mL de etanol al 95 % (v/v). Se agitó vigorosamente y se adicionaron otros 4 mL de etanol y el contenido se mezcló por inversión. El tubo se dejó reposar toda la noche y al día siguiente se centrifugó a 2000 g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y los residuos de etanol se evaporaron en un horno a 40 °C.

Las pastillas se resuspendieron en 2 mL de DMSO y los tubos se colocaron en baño María a ebullición durante 15 minutos con agitaciones ocasionales que ayudaron a su resuspensión. Agitando continuamente para evitar que se formaran grumos, se agregaron 4 mL del buffer de Con A (*ver apéndice N^o*), después de mezclar se adicionaron otros 4 mL del buffer de Con A. Esta mezcla se usó para realizar las determinaciones de amilosa y almidón total y se le denominó **solución I**.

Determinación de amilosa.

Para determinar el contenido de amilosa se tomaron 500 µL de la **solución I**, se pusieron en un tubo eppendorf y enseguida se adicionaron 250 µL de la solución de Con A. El contenido se mezcló por inversión y se dejó reposar 1 hora a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 1400 g por 10 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante que se obtuvo se denominó como **solución II**. De esta última solución se tomaron 500 µL y se depositaron en un tubo de ensaye al que luego se adicionaron 1.5 mL de buffer de acetato de sodio 100 mM pH 4.5, para poder llevar el pH alrededor de 5. En otros tubos se pusieron 250 µL de la solución I y se agregaron 2 mL del buffer de acetato de sodio. Una vez listos todos los tubos, se taparon con canicas y se colocaron 5 minutos en baño María a ebullición para desnaturalizar la Con A. Transcurrido ese tiempo, los tubos se incubaron por 5 minutos en otro baño que tenía una temperatura de 40 °C. Después se agregaron 50 µL de la mezcla de enzimas (amiloglucosidasa/ alfa -amilasa) estos se incubaron por 30 minutos a 40 °C y terminado ese tiempo se centrifugó a 2000 g por 5 minutos. Del sobrenadante se tomaron 500 µL y se les agregaron 2 mL del reactivo de enzimas “GOPOD” (Glucosa Oxidasa, PerOxiDasa y 4-aminoantipirina). Junto con el blanco (500 µL de acetato de sodio 100 mM pH 4.5 y 2 mL “GOPOD”) y el control positivo (50 µL de glucosa estándar más 450 µL de acetato de sodio 100 mM pH 4.5 y 2 mL “GOPOD”), todos los tubos se incubaron a 40 °C por 20 minutos. Por último los tubos se leyeron en el espectrofotómetro a 510 nm y

para determinar el porcentaje de amilosa presente en el almidón se hizo uso de la expresión que se presenta abajo, donde 66.8 es el valor del factor de dilución.

$$\% \text{ Amilosa (w/w)} = \frac{\text{Absorbancia del sobrenadante con el buffer de "Con A"}}{\text{Absorbancia del almidón total}} \times 66.8$$

4.11.4 Degradación enzimática del almidón de semilla de frijol.

Para este experimento se usaron 10 mg del almidón purificado. Esta cantidad se colocó en un tubo eppendorf, se agregó 1 mL de etanol al 80% y se calentó en baño María a 80 °C por 10 minutos. Después, se centrifugó por 3 minutos a 13000 rpm, se retiró el sobrenadante y el lavado se repitió una vez más. Para eliminar los residuos de etanol el tubo se colocó en baño María a 80 °C. Una vez seco, el almidón se resuspendió en 1.2 mL de agua desionizada, se mezcló en el vórtex hasta obtener una mezcla homogénea. De esa suspensión se tomaron 100 µL que se pusieron en tubos eppendorf. Uno de ellos se utilizó como control y para garantizar que el almidón se degradara por completo, se calentó en baño María a ebullición por 30 minutos. A todos se les agregaron 25 µL de una mezcla que contenía 1.2 mL de acetato de sodio 0.5 M (pH 4.5), y 6 mg de la enzima amiloglucosidasa. Todos los tubos se incubaron en baño María a 50 °C de donde se fueron removiendo a diferentes tiempos (0,1,2,4,5,6 y 24 hrs.). El control se incubó por 24 hrs. Durante el periodo de incubación los tubos se agitaron periódicamente. La reacción fue detenida adicionando 100 µL de DNS (*ver apéndice N^o*) y luego se agitó en vórtex. Después se colocaron en baño María a temperatura de ebullición por 5 minutos. Se dejaron enfriar y se adicionó 1 mL de agua destilada y por último se leyó en el espectrofotómetro a 540 nm. Los valores se expresaron como porcentaje con respecto a lo obtenido en el tubo control en donde el calentamiento previo a la hidrólisis enzimática, garantiza que la degradación sea total.

5.0 Resultados.

5.1 Estudio del efecto de la deficiencia de Pi sobre la producción de biomasa en plantas de frijol.

La primera etapa de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la deficiencia de Pi sobre el crecimiento y producción de biomasa (con especial interés en la producción de semilla) de plantas de frijol. Para ello las plantas se dividieron en dos grupos. Uno fue regado con solución nutritiva Hoagland y 500 μM Pi (control), mientras que en el otro la cantidad de Pi presente en la solución nutritiva fue de 100 μM , cantidad que en trabajos previos analizados en el laboratorio se ha observado es la mínima necesaria para que las plantas sean capaces de producir semillas.

5.1.1 Determinación de la biomasa.

Se evaluó el efecto de la deficiencia de Pi sobre el peso seco de la parte aérea y de la raíz. Como puede observarse en la **figura 1** la falta de fosfato redujo en 66.2 % el crecimiento de hojas y en 62.4% el de raíces.

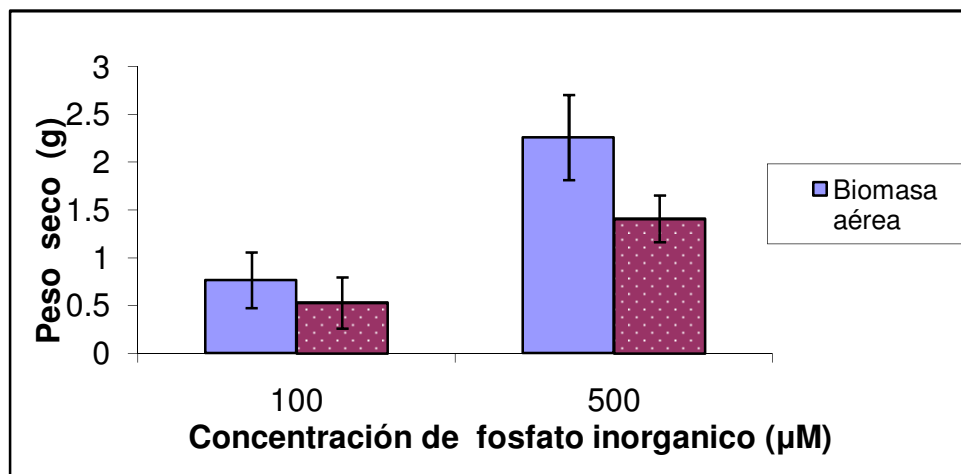


Figura 1. Efecto de la deficiencia de fosfato sobre la producción de biomasa en la parte aérea y en la raíz de plantas de frijol.

En la etapa reproductiva, se efectuaron conteos periódicos del número de flores y vainas. Al término del ciclo de vida de las plantas, se contó el número de semillas que cada una produjo. En la **figura 2a** se puede observar que la deficiencia de fosfato redujo en un 38.5%

el número de flores, pero tuvo un impacto mayor sobre el número de semillas ya que disminuyó en un 75%. En la **figura 2b** se muestra el efecto de la concentración de fosfato sobre el número de vainas. Las plantas regadas con 500 μM de Pi produjeron mas vainas, la mayoría de las cuales también cayeron antes de finalizar el ciclo. Las plantas sometidas a deficiencia de Pi, produjeron menos vainas, la mayoría de las cuales también cayó antes de terminar el ciclo.

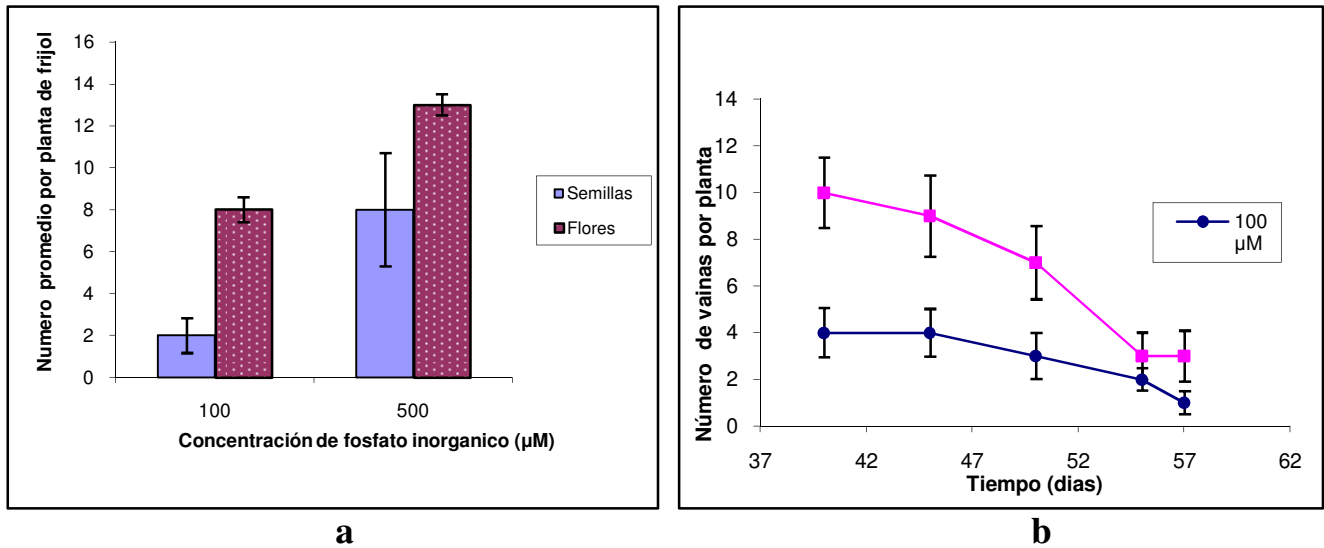


Figura 2. Efecto de la deficiencia de fosfato sobre el número de flores y semillas producidas por plantas de frijol (a) y en el número de vainas (b).

El análisis incluyó la determinación del peso seco de las vainas y como se muestra en la **figura 3a**, la deficiencia de Pi redujo en 49.8% el peso de las mismas, sin embargo, no alteró su longitud ya que solo hubo una disminución del 15.2% (**figura 3b**).

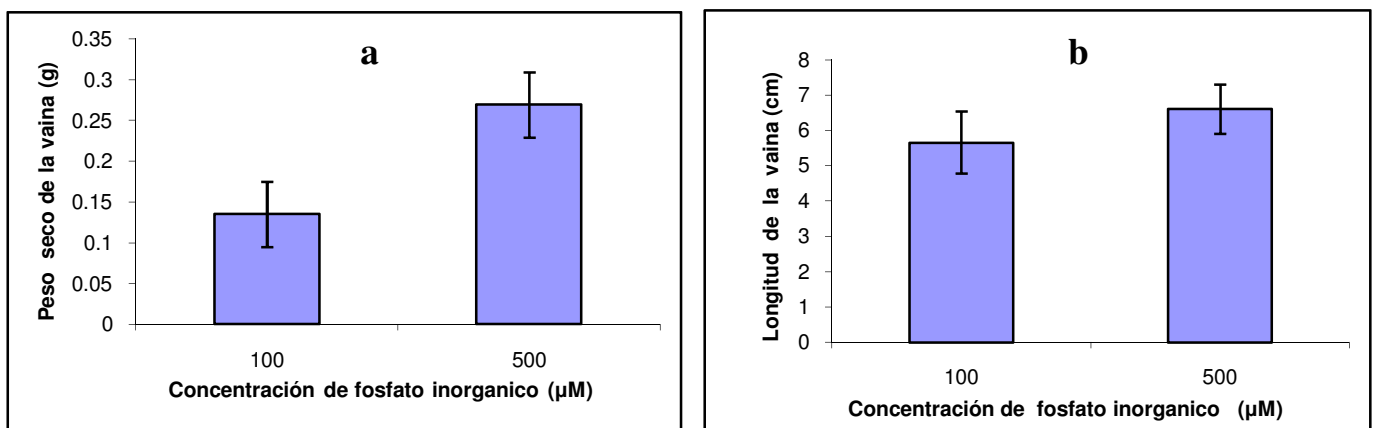


Figura 3. Efecto de la deficiencia de Pi sobre el peso seco (a) y la longitud (b) de las vainas de frijol.

También se estimó el efecto de la deficiencia de Pi sobre el peso seco de las semillas. Como se puede apreciar en la **figura 4**, no se detectó un efecto significativo.

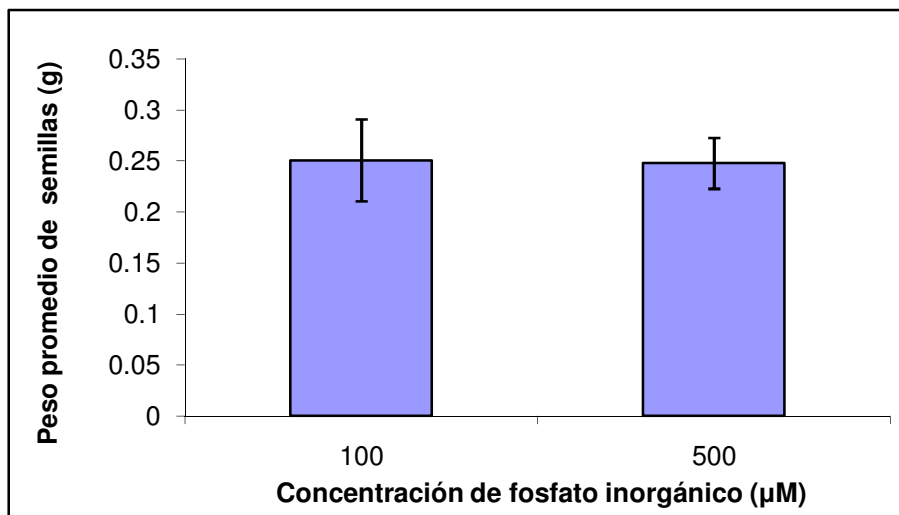


Figura 4. Efecto de la deficiencia de Pi sobre el peso seco de las semillas.

5.2 Estudio del efecto de la deficiencia de Pi sobre las características de la harina de semillas de frijol.

Después de establecer los efectos de la falta de Pi sobre la producción de biomasa, la segunda etapa del trabajo se dirigió a investigar si la falta de Pi modifica de alguna manera las características de la harina obtenida a partir de las semillas de frijol. Primeramente se determinó la cantidad de Pi presente en la harina. La **figura 5** no muestra diferencias significativas.

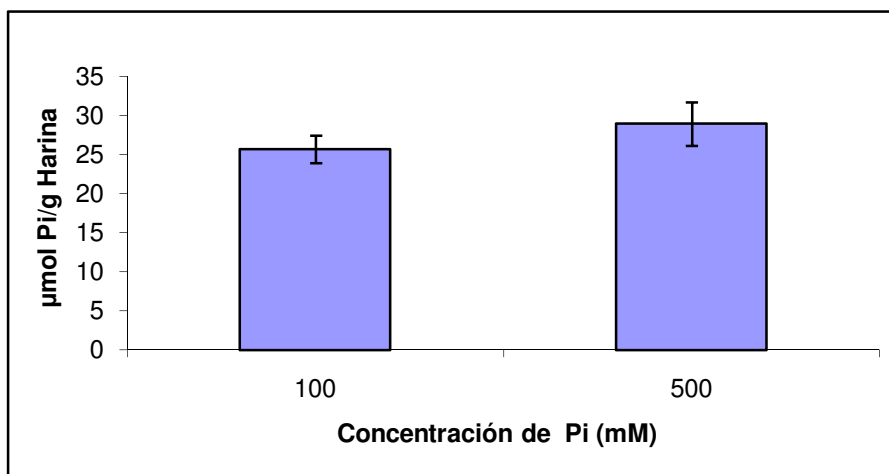


Figura 5. Efecto de la deficiencia de Pi sobre el contenido de fosfato inorgánico presente en la harina de semillas de frijol.

También se determinó la cantidad de proteína soluble presente en la harina. Como se muestra en la **figura 6**, tampoco se observan diferencias significativas que pudieran ser atribuidas a la falta de Pi.

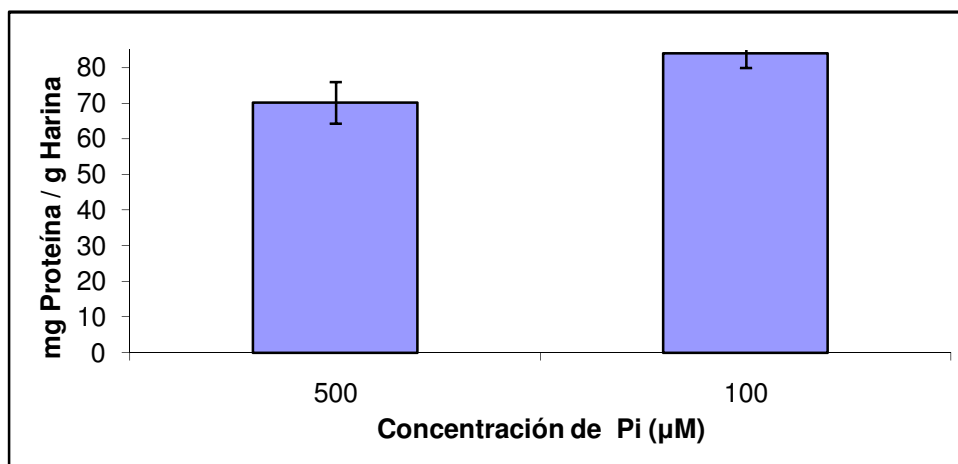


Figura 6. Efecto de la deficiencia de Pi sobre el contenido de proteína soluble presente en la harina de semillas de frijol.

La cantidad de azúcares solubles (sacarosa, glucosa y fructosa) presentes en la harina también fue medida. En lo que respecta al contenido de sacarosa, en la **figura 7**, se observa que no hay diferencias significativas que pudieran atribuirse a la falta de Pi.

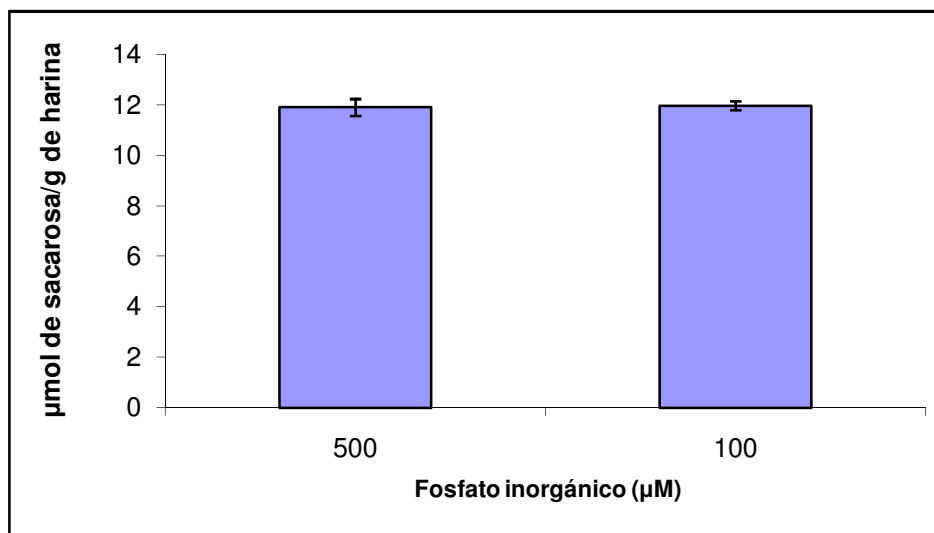


Figura 7. Efecto de la deficiencia de Pi sobre el contenido de sacarosa en harina de semillas de frijol

Las cantidades de fructosa y glucosa presentes fue tan baja que no fue posible hacer mediciones confiables.

5.3 Análisis del efecto de la deficiencia de Pi sobre las características de las proteínas solubles.

El contenido de proteínas en las semillas de frijol fue elevado (70.25 y 80.05 mg/g para la harina proveniente de semillas cultivadas con Pi suficiente y bajo condiciones deficientes respectivamente). Dado que la deficiencia de Pi modificó este parámetro también investigamos si la falta de fosfato alteró el patrón de las proteínas solubles presentes en la harina de las semillas de frijol y como muchas de las proteínas presentes en las semillas están glicosiladas, también se investigó si la deficiencia de Pi alteraba el patrón de glicosilación.

La proteína soluble (10 µg) se analizó en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie para evaluar el total de proteínas presentes en ambos casos o con reactivos que permiten visualizar proteínas glicosiladas (*Gel CODE Glycoprotein staining kit*). La **figura 8** no muestra cambios significativos en los patrones de proteínas totales (A) o glicosiladas (B) que pudieran ser atribuidos a la deficiencia de Pi.

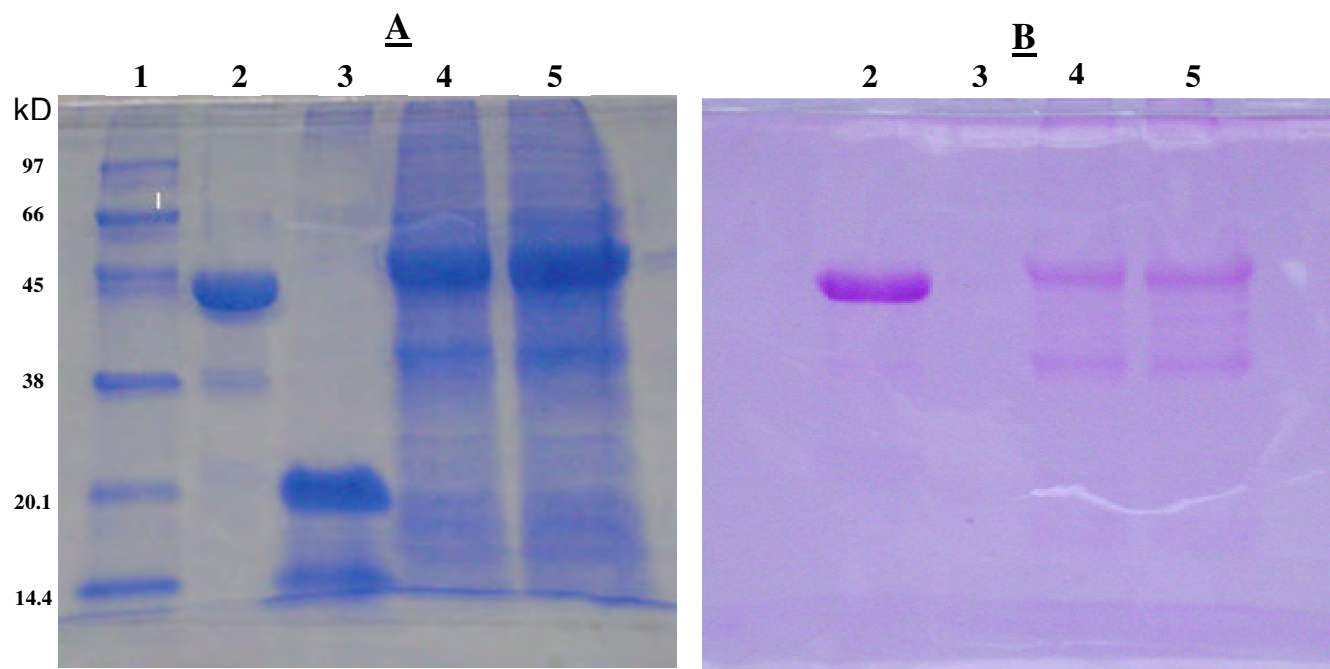


Figura 8. Geles que muestran el efecto de la deficiencia de Pi sobre las proteínas totales (A) y glicosiladas (B). (1) marcadores, (2) control (+) (peróxidasa de caballo), (3) control(-) (inhibidor de tripsina de soya) (4) proteínas solubles de la harina de semillas cultivadas con 500 y (5) proteínas solubles de semillas cultivadas con 100 µM de Pi.

Los marcadores utilizados fueron: alfa- lactoglobulina (14.4 kD), Inhibidor de tripsina (20.1 kD), Anhidrasa carbónica (30 kD), Ovoalbúmina (45 kD), Albúmina (66 kD) y Fosforilasa B (97 kD).

5.4 Estudio del efecto de deficiencia de Pi sobre el tamaño de los gránulos de almidón.

Con el fin de evaluar el efecto de la deficiencia de Pi sobre algunas de las propiedades del almidón, se llevó a cabo un proceso de purificación. El almidón purificado se analizó por microscopía electrónica y como se puede observar en la **figura 9** los gránulos de frijol son de apariencia ovalada. La falta de Pi de acuerdo a la **figura 9A** y **figura 9B** no parece haber modificado el tamaño de los gránulos de almidón y además los gránulos producidos por las plantas cultivadas con Pi óptimo aparecen aglomerados y rodeados por una membrana (**figura 9B**).

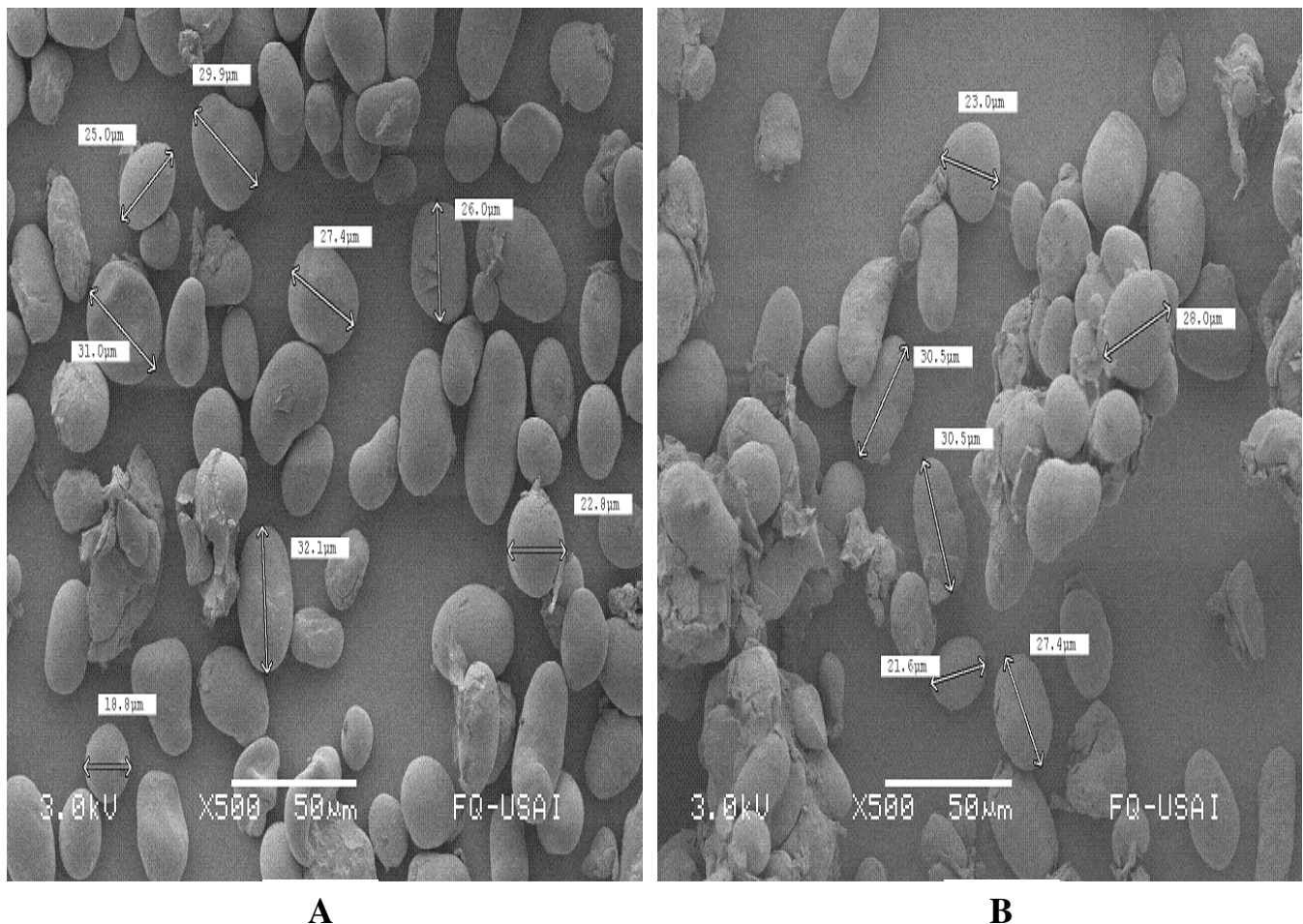


Figura 9. Fotografías de microscopía electrónica que muestran la distribución de los gránulos de almidón de plantas cultivadas en deficiencia de fósforo **A** y almidón de plantas control **B**.

5.5 Análisis del efecto de la deficiencia de Pi sobre las características del almidón.

La siguiente etapa consistió en analizar detalladamente los efectos de la deficiencia de Pi sobre algunas de las propiedades más importantes del almidón. En la **figura 10** se puede ver que el contenido de almidón en ambos grupos estudiados no muestra un cambio relevante.

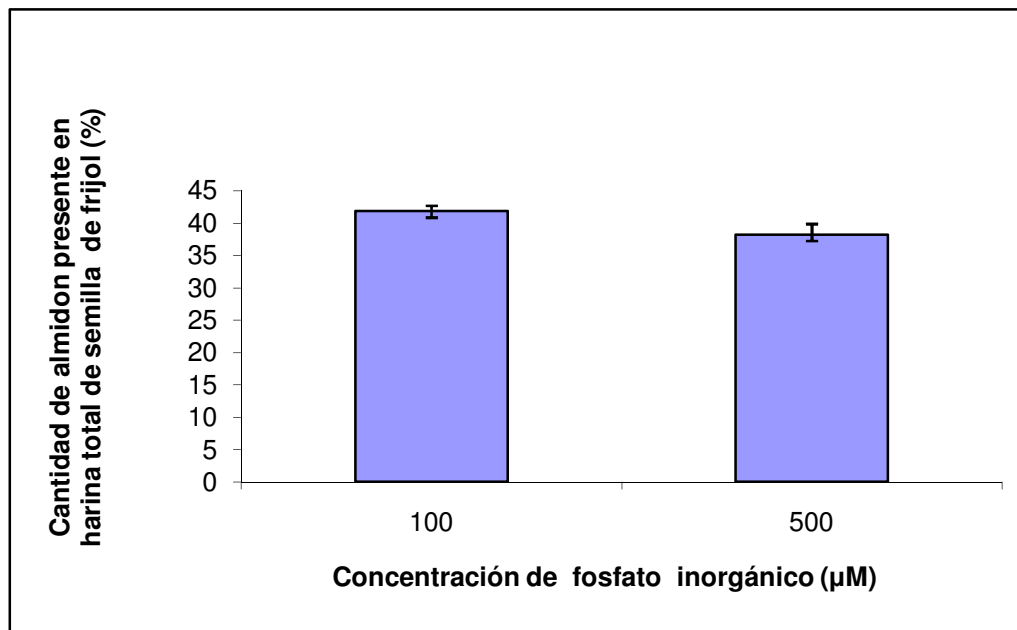


Figura 10 Efecto de la deficiencia de Pi sobre el contenido de almidón en la harina de semillas de frijol

Previamente se mencionó que el análisis de la harina de frijol no mostró diferencias en el contenido de Pi que pudieran ser atribuidas a las condiciones en que las plantas analizadas fueron cultivadas (**figura 5**). Muchas de las propiedades del almidón dependen de su grado de fosforilación. El análisis del contenido de Pi en el almidón se presenta en la **figura 11**, y muestra que el almidón proveniente de plantas regadas con la solución nutritiva que contenía 500 μM de Pi está más fosforilado.

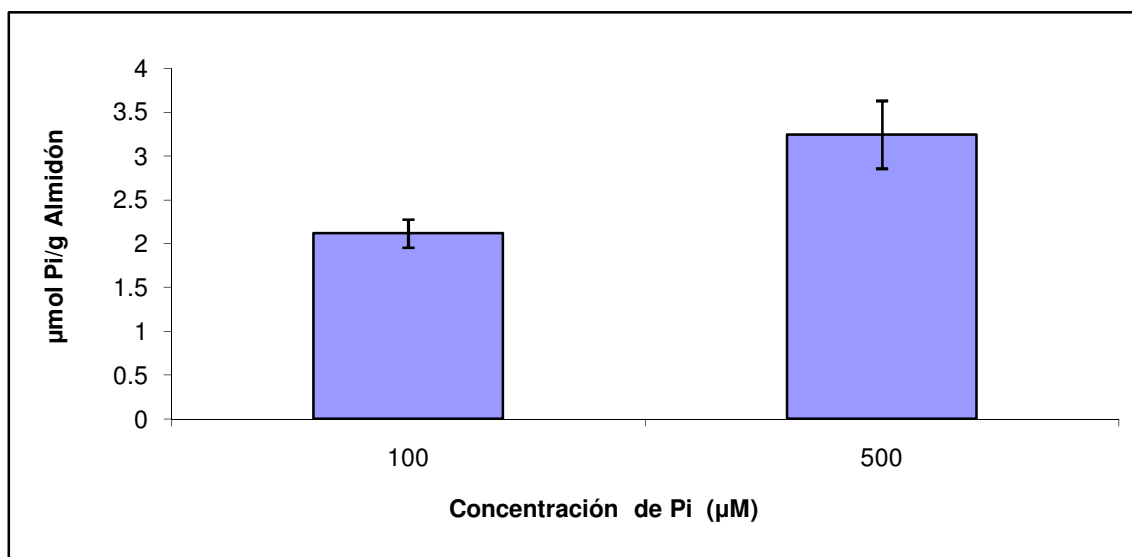


Figura 11 Determinación del fosfato inorgánico presente en el almidón de los dos grupos (Pi + y Pi -) de semillas de frijol

Otro aspecto importante del análisis fue investigar si la deficiencia de fosfato afecta los contenidos de amilosa y amilopectina. Como se muestra en las **figuras 12a y 12b**, la deficiencia de fosfato no modificó los porcentajes de amilosa y amilopectina.

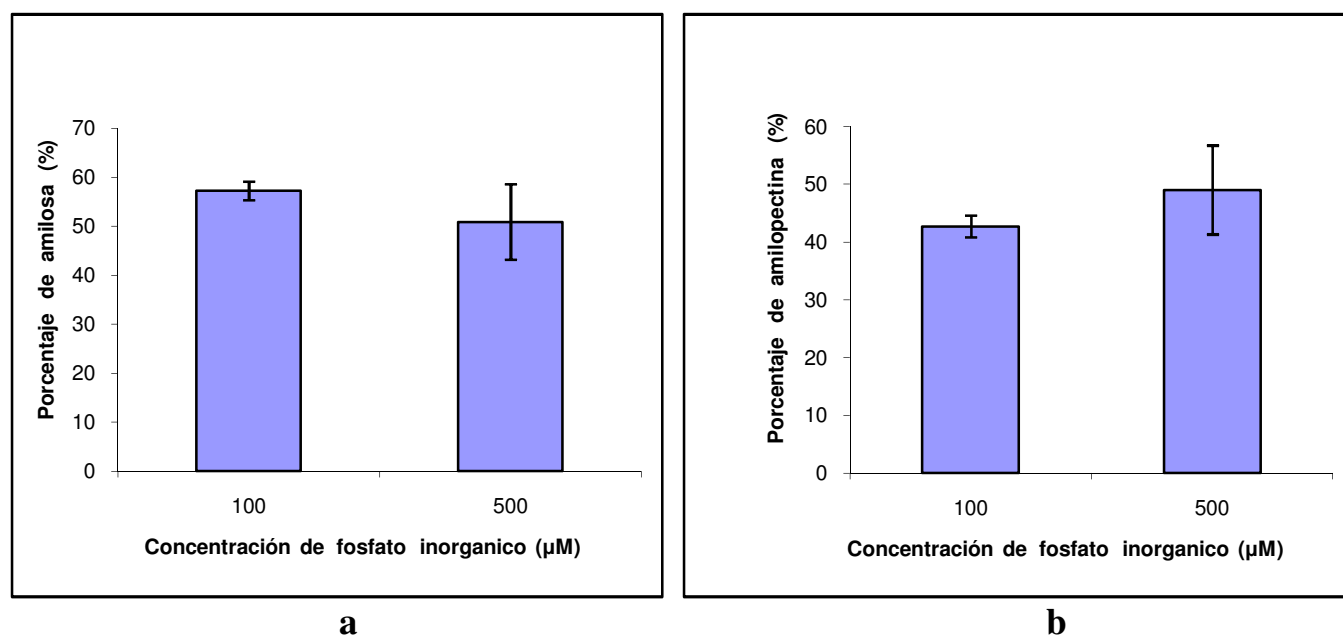


Figura 12 Efecto de la deficiencia de fosfato sobre el contenido de amilosa (a) y amilopectina (b) en el almidón de semillas de frijol

5.6 Degradación de almidón de semilla de frijol por ensayo enzimático.

Como parte de la caracterización del efecto de la deficiencia de fosfato sobre las propiedades del almidón, también se estudió la susceptibilidad a la degradación con amiloglucosidasa. En la **figura 13** se puede observar que el almidón proveniente de de semillas producidas por plantas de fríjol cultivadas con la concentración de 500 μM Pi fue más susceptible. La diferencia que se observó a lo largo de todo el experimento se hizo mas evidente a partir de las 6 hrs.

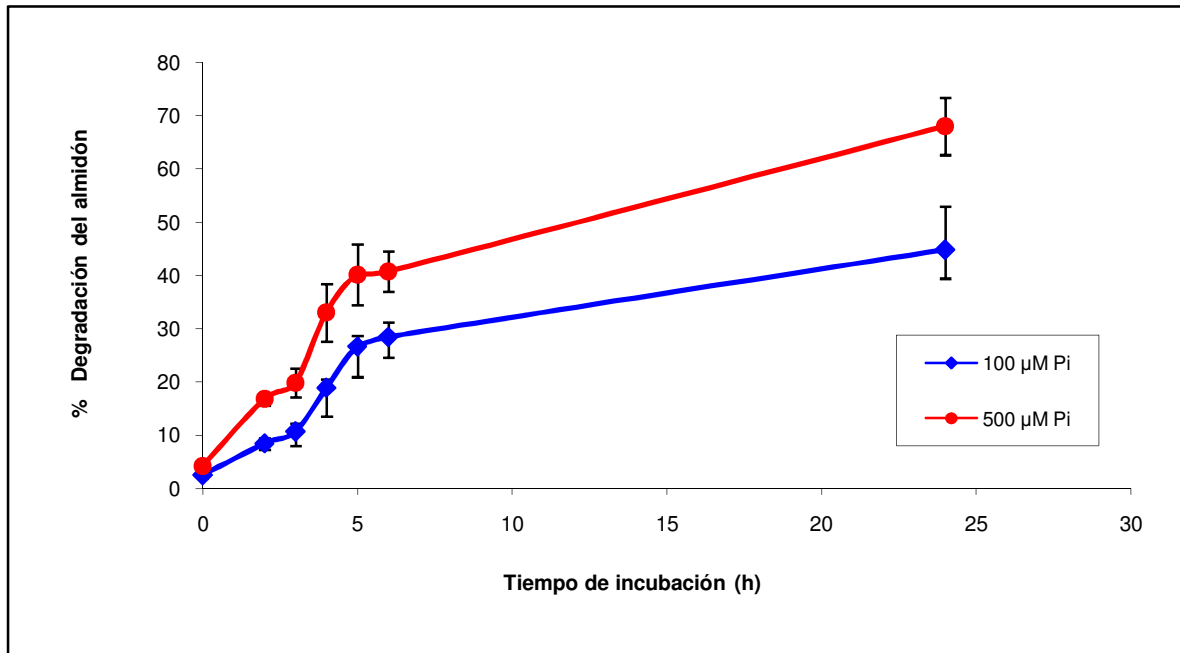


Figura 13 Efecto de la deficiencia de fosfato sobre la cinética de degradación de almidón con amiloglucosidasa .

6.0 Discusión

Los resultados obtenidos en la presente investigación confirman el efecto negativo que la deficiencia de Pi tiene sobre el crecimiento y la productividad de las plantas: el peso seco de las plantas disminuyó en 64.7% (figura 1), mientras que la producción de flores y semillas lo hicieron en un 38.5% y 75% respectivamente (figura 2a). En lo que se refiere a las características de las semillas la deficiencia de Pi no modificó una serie de variables importantes: contenido de fosfato (figura 5), sacarosa (figura 7), almidón (figura 10), proteína (figura 6) o la proporción de proteínas glicosiladas (figura 8). Estos datos pueden interpretarse como que ante la imposibilidad de las plantas sometidas a deficiencia de Pi para producir muchas semillas, se sacrifica el número, pero se garantiza que las que se producen, cuando germinen den origen a plantas vigorosas. Existen reportes que indican que la falta de Pi disminuye la cantidad de fotosintatos disponibles para el desarrollo de las semillas y sin duda será muy interesante investigar que mecanismos son los que permiten ajustar el desarrollo de las semillas con la disponibilidad de fotosintatos.

El análisis del almidón purificado reveló que la falta de Pi no modificó la morfología de los gránulos (figura 9) ni la proporción de amilosa:amilopectina (figura 12 a y b). Sin embargo, el almidón de las semillas de plantas crecidas en deficiencia de fosfato esta menos fosforilado (figura 11). Este resultado es hasta cierto punto sorprendente, pues el contenido de Pi en la semilla no se afectó de manera significativa (figura 5), pero concuerdan con el efecto negativo que de la deficiencia de Pi tiene sobre el grado de fosforilación del almidón de tubérculos de papa¹⁰. El grado de fosforilación es una característica que mejora muchas de las propiedades funcionales del almidón¹⁸ de las cuales dependen sus usos industriales. En ese sentido es muy posible que el almidón producido por plantas cultivadas en deficiencia de Pi sea de menor calidad. Sin embargo, junto con la menor fosforilación, el almidón de las semillas cultivadas en deficiencia de Pi también fue más resistente a la degradación enzimática (figura 13). Es interesante resaltar que el almidón que se acumula en las hojas está sometido a una regulación similar: la deficiencia de Pi reduce el grado de fosforilación y con ello, también disminuye la degradación³

En estudios recientes se ha reportado que el almidón resistente al ataque enzimático puede favorecer el desarrollo de la microbiota del sistema digestivo, la cual puede utilizar esa fracción de almidón para producir ácidos grasos de cadena corta (butirato, propionato y acetato) los cuales tienen una serie de efectos benéficos dentro de los que destacan el ayudar a mantener sano el tracto digestivo y prevenir cáncer de colon.¹²

Así como se mencionó la posibilidad de que el almidón producido por plantas cultivadas con deficiencia de Pi al estar menos fosforilado pudiera ser de menor calidad para la elaboración de diversos productos industriales, también es necesario resaltar que al ser más resistente al ataque enzimático, podría ser utilizado como materia prima para la elaboración de alimentos que al ser ingeridos promuevan el crecimiento de microbiota benéfica para la salud de quien los consume (alimentos funcionales).

7.0 Conclusiones

De acuerdo con los análisis realizados a los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir lo siguiente:

1. Que las plantas de frijol (C60) sometidas a deficiencia de Pi, disminuyeron su productividad, pero la mayor parte de las características de las semillas no fueron afectadas.
2. La falta de Pi disminuyó el grado de fosforilación del almidón y su susceptibilidad a la degradación enzimática.
3. Dada la relación que la fosforilación tiene con muchas propiedades funcionales del almidón, es muy posible que el almidón proveniente de plantas cultivadas con deficiencia de Pi sea de menor calidad.
4. El almidón producido por plantas cultivadas con deficiencia de Pi es más resistente a la degradación enzimática por lo que podría utilizarse en la elaboración de alimentos funcionales.

8.0 Apéndices

Apéndice I Preparación de soluciones

Reactivo de Bradford

Se pesan 0.25 g de azul de Coomassie G, se le adicionan 25.9 mL de ácido perclórico (HClO₄) y la solución se lleva a un volumen final de 500 mL con agua destilada.

Ácido acético al 3%

Mezclar 30 mL de ácido acético glacial con 970 mL de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Metanol al 50%

Mezclar 250 mL de metanol con 250 mL de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución oxidante (ácido periódico)

Adicionar 250 mL de ácido acético 3% a la botella etiquetada como “reactivo oxidante” y mezclar hasta disolver completamente. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución reductora (metabisulfito de sodio)

Adicionar 250 mL de agua destilada a la botella etiquetada como “reactivo reductor” y mezclar hasta disolver completamente. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución Hoagland 1x

Para preparar la solución de riego primero se deben elaborar las siguientes soluciones

Solución macronutrientes 1x

Para la preparación de esta solución apoyarse en las cantidades mostradas en la siguiente tabla y adicionar en el orden en el que aparecen en la misma.

Compuesto	CANTIDAD g/L 500µM Pi (+)	CANTIDAD g/L 100µM Pi (-)
KNO ₃	0.6066	0.6066
Ca(NO ₃) ₂	0.9448	0.9448
MgSO ₄	0.493	0.493
(NH ₄)H ₂ PO ₄	0.0575	-
(NH ₂) ₂ SO ₄	-	0.066
EDTA-Fe	0.01	0.01

Nota: Adicionar el siguiente compuesto solo hasta que se halla disuelto completamente el anterior.

Solución micronutrientos 1x

Para la preparación de esta solución apoyarse en las cantidades mostradas en la siguiente tabla

Compuesto	Cantidad g/L
MnCl ₂	0.00178
H ₃ BO ₃	0.00284
ZnSO ₄	0.00023
CuSO ₄	0.000749
(NH ₄)Mo	0.0000179

Una vez que se tengan las soluciones ahora lo que se realiza es, agregar 400 mL de la solución de micronutrientos a un litro de la solución de macronutrientos, se mezcla y se ajusta el pH a 5.2-5.4 de ser necesario con KOH y se almacena a temperatura ambiente. Pueden prepararse soluciones de macro y micronutrientos 5X para facilitar el pesado de los componentes y luego diluir para obtener una solución 1X.

Mezcla de reacción para medición de glucosa

Para obtener esta solución hay que apoyarse en las cantidades que se presentan en la siguiente tabla

Reactivo	Cantidad por 1 muestra
Buffer 4X pH 8	250 µL
ATP (20mM)	50 µL
NAD	0.13 mg
Hexocinasa (HK)	1 U/mL
Agua desionizada	625 µL

Nota: el buffer 4x pH 8 contiene TRIS-HCl 100 mM y KCl 400 mM

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA 4X (buffer de muestra)

Pesar y adicionar en un vaso de precipitados de 250 mL con 90 mL de agua desionizada 1.57g de TRIS-HCl, agitar hasta disolver y posteriormente agregar 2.98g de KCl, agitar y

ajustar el pH a 8. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 100mL y llevar al aforo con agua desionizada

Preparación de DNS (ácido 3,5-Dinitrosalicílico)

Pesar 1 g de ácido 3,5-Dinitrosalicílico y disolver en 50 mL de agua destilada, posteriormente agregar 30 g de tartrato de sodio o de potasio tetrahidrato muy lentamente y finalmente adicionar 20mL de NaOH 2N y llevar a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

Solución amortiguadora para extracción de almidón

Para la preparación de este buffer se adicionan 20mL de TRIS pH 7.2 (1M), 20 mL de etilenglicol y 2mL de EDTA (500mM) y se lleva a un volumen final de 200mL con agua destilada.

Solución amortiguadora de corrida

Pesar 3g de TRIS (25 mM), 14.4g de glicina (192 mM) y 1g de SDS 0.1%, llevar a un volumen final de un litro con agua destilada; el pH final debe ser aproximadamente 8.3. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución de azul de Coomassie para tinción de gel

Pesar 1 g de azul de Coomassie, adicionar 450 ml de metanol, 450 ml de agua destilada y 100 ml de ácido acético glacial

Reactivos para la determinación de amilosa y amilopectina

Reactivo 1. Disolver el contenido de la botella 1 del kit (liofilizado de Con A (200mg)) en 50 mL de solución Buffer de Con A. Esta solución es estable por mas de 2 años a -20°C .

Reactivo 2. Disolver el contenido de la botella 2 (amiloglucosidasa (200U en p-nitrofenil β maltosido) α -amilasa fúngica (500 U en reactivo Ceralpha at pH 5.0 y 40°C)) en 20 mL de buffer de acetato de sodio (100mM, pH 4.5). Esta solución es estable por mas de 2 años a -20°C .

Reactivo 3. Disolver el contenido de la botella 3 (buffer de fosfato de potasio (1M, pH 7.4), ácido p- hidroxibenzoico (0.22M) y azida de sodio (0.02% w/w)) en 1 L de agua destilada. Esta solución debe utilizarse de inmediato

Reactivo 4. Disolver el contenido de la botella 4 (Glucosa Oxidasa (> 12,000 U) Peroxidasa (> 650 U) y 4-aminoantipirina (80 mg)) con 20 mL del reactivo 3 y transferir cuantitativamente esta en la botella del reactivo 3. Cubrir la botella con aluminio y mantener en un lugar alejado de la luz. Este es el reactivo “**GOPOD**”. Esta solución es estable por aproximadamente 12 meses a -20°C .

Reactivos 5 y 6. Usar el contenido de la botella 5 (solución estándar de glucosa (5 mL, 1.0 mg/mL) en 0.2% (w/v) de ácido benzoico) y 6 (muestra de referencia de almidón (con contenido específico de amilosa). Estable por más de 5 años a temperatura ambiente.

Amortiguadores y soluciones para determinación de amilosa y amilopectina

1. Solución amortiguadora de Acetato de Sodio (100 mM, pH 4.5)

Adicionar 5.9 mL de ácido acético glacial (1.05 g/mL) en 900 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 4.5 con hidróxido de sodio 1M (aprox. se requieren 30 mL). Adicionar 0.2 g de azida de sodio y llevar a un volumen final de 1L. Esta solución es estable por mas de 2 años a temperatura ambiente.

2. Buffer de Con A (Buffer de Acetato de Sodio 600 mM, pH 6.4)

Disolver 49.2 g de acetato de sodio anhidro, 175.5 g de cloruro de sodio, 0.5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.7 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.7 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 900 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 6.4 con ácido acético glacial y llevar a un volumen final de 1 L con agua destilada. La solución amortiguadora es estable por 2 semanas a 4°C .

3. Solución Con A

Tomar 30 mL del buffer de Con A y agregar 700 mL de agua destilada. Usar el mismo día de la preparación.

Apéndice II TÉCNICAS

Gel de poliacrilamida al 12.5 % (SDS-PAGE)

Preparación del gel de corrida

1. Ensamblar, según instrucciones de la casa comercial, el cassette que consta de soportes, vidrios y separadores.
2. Preparar el gel de corrida. El volumen del gel de corrida deberá calcularse dependiendo del grosor del gel. Para este caso se prepararon 10 ml de acrilamida al 12.5% y las cantidades requeridas para este se muestran en la siguiente tabla

REACTIVOS	GEL DE CORRIDA Cantidades para 1 gel
Acrilamida 30%	2.1 mL
Buffer 8X (pH 8.8) [1.5M]	0.625 mL
SDS 10%	25 µL
Agua destilada	2.26 mL
APS 10%	37.5 µL
TEMED	4 µL

3. Se vierte cuidadosamente la solución de acrilamida con una pipeta pasteur o con una micropipeta en el contenedor representado por 2 vidrios sujetos al cassette y distanciados por unos separadores según se muestra a continuación:

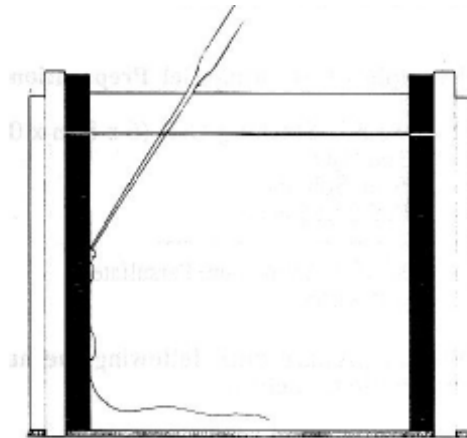


Figura I Introducción de la solución de acrilamida (gel de corrida) entre los vidrios

4. Dejar aproximadamente 1,5 cm de distancia entre la solución de acrilamida y el vidrio frontal

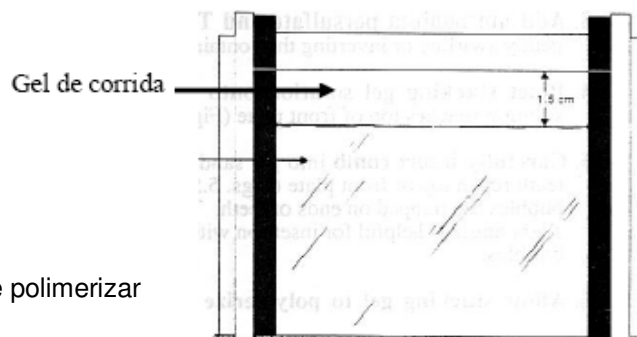


Figura II Gel de corrida antes de polimerizar

5. Luego de añadido el gel de corrida, y previo a la polimerización, añadir suavemente agua destilada para evitar que el borde del gel polimerice de manera irregular.

6. Esperar unos 15-20 minutos para una polimerización total del gel.

Preparación del gel de apilamiento

7. Luego de polimerizado el gel de corrida, descartar el agua de la superficie del mismo y preparar 4 ml del gel de apilamiento (4%) según las cantidades indicadas en la tabla de abajo.

REACTIVOS	GEL APILADOR Cantidades para 1 gel
Acrilamida 30%	0.4 mL
Buffer 8X (pH 8.8) [1.5M]	0.5 mL
SDS 10%	10 μ L
Agua destilada	1.1 mL
APS 10%	20 μ L
TEMED	4 μ L

8. Verter suavemente el contenido del gel de apilamiento sobre el gel de corrida polimerizado y colocar el peine cuidadosamente para que no se formen burbujas

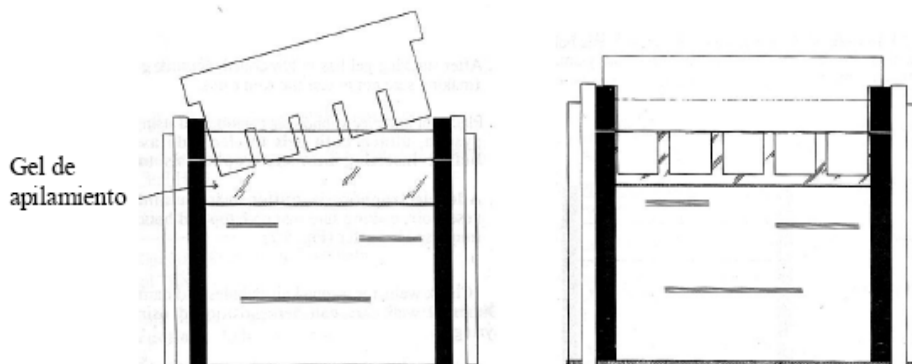


Figura III Colocación del gel de apilamiento y del peine

9. Esperar unos 30 minutos hasta que polimerice la acrilamida.

9.0 Bibliografía

1. Aggarwal V., Singh N., Kamboj S., Brar P. 2004. Some properties of seeds and starches separated from different Indian pea cultivars. *Food Chemistry*, 85: 585-590.
2. Bernal L., Coello P., Acosta J., Martínez E. 2007. Efecto de la deficiencia de fósforo en el metabolismo de carbono de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Agrocien- cia*, 41: 417-423.
3. Bernal L., Martínez Barajas E. 2006. Una nueva visión de la degradación del almi- dón. *Revista del centro de investigación*. vol. 7: 77-90.
4. Blennow A., Bay- Smidt A., Wischmann B., Olsen C., Müller B. 1998. The degree of starch phosphorylation is related to the chain length distribution of the neutral and the phosphorylated chains of amylopectin. *Carbohydrate Research*. 307: 45-54.
5. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
6. Chi H., Xu K., Wu X., Chen Q., Xue D., Song C., Zhang W., Wang P. 2008. Effect of acetylation on the properties of corn starch. *Food Chemistry*. 106: 923-928.
7. Gallant D., Bouchet B., Baldwin P. 1997. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate polymers*. 32: 177-191.
8. Gunaratne A., Corke H. 2008. Effect of hydroxypropyl β -cyclodextrin on physical properties and transition parameters of amylose-lipid complexes of native and acetylated starches. *Food Chemistry*. 108: 14-22.
9. Kohashi, Josué. 1990. *Phaseolus vulgaris* l. Colegio de Posgraduados, México:5-18

10. Muhrbeck P., Svensson E. 1996. Annealing properties of potato starches with different degrees of phosphorylation. *Carbohydrate Polymers*. 31: 263-267.
11. Noda T., Tsuda S., Mori M., Takigawa S., Matsura- Endo C., Kim S., Hashimoto N., Yamauchi H. 2006. Determination of the phosphorus content in potato starch using an energy-dispersive X-ray fluorescence method. *Food Chemistry*. 95: 632-637.
12. Nugent A. 2005. Health properties of resistant starch. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*. 30: 27-54.
13. Parra C., Martínez E., Acosta J., Coello P. 2004. Respuesta a la deficiencia de fosfato de genotipos de frijol contrastantes en su capacidad de crecer en suelos con bajo contenido de fósforo. *Agrociencia*. 38: 131-139.
14. Rincón A., Rached L., Aragoza L., Padilla F. 2007. Efecto de la acetilación y oxidación sobre algunas propiedades del almidón de semillas de Fruto de pan (*Artocarpus altilis*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57, Num 3.
15. Schmitz C., Simas K., Santos K., Joa J., Mello R., Amante E. 2006. Cassava starch functional properties by etherification – hydroxypropylation. *International Journal of food and technology*. 41: 681-687.
16. Sívoli L., Pérez E., Rodríguez P., De Abrisqueta A., Raymúndez M. 2005. Cambios en la estructura granular durante el proceso de modificación química (fosfatado-acetilado) del almidón de yuca analizados por microscopía óptica y electrónica. *Acta microscópica*. 14: 5-9.
17. Singh S., Singh G., Singh P., Singh N. 2008. Effect of water stress at different stages of grain development on the characteristics of starch and protein of different wheat varieties. *Food Chemistry*. 108:130-139.

18. Stahl J., Lobato L., Bochi V., Kubola E., Gutkoski L., Emanuelli T. 2007. Physico-chemical properties of Pinhaõ (*Araucaria angustifolia*, Bert, O. Ktze) starch phosphates. *LWT*. 40: 1206-1214.
19. Tester R., Karkalas J., Oi X. 2004. Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. 39: 151-165.
20. Topping D., Clifton P. 2001. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiological Reviews*. 81: 1031-1064.
21. Wang T., Bogracheva T., Hedley C. 1998. Starch: as simple as A, B, C?. *Journal of Experimental Botany*. 49: 481-502.
22. Vargas A., Osorio P., Agama E., Morales L., Bello L. 2006. Digestibilidad del almidón en diferentes variedades de fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Inverciencia*, 31: 881-884.
23. Yan X., Liao H., Trull M., Beebe S., Lynch J. 2001. Induction of a Major Leaf Acid Phosphatase Does Not Confer Adaptation to Low Phosphorus Availability in Common Bean. *Plant Physiology*. 125: 1901-1911.
24. Zhang T., Oates C. 1999. Relationship between α -amylase degradation and physico-chemical properties of sweet potato starches. *Food Chemistry*. 65: 157-163.
25. Zhao H., Dai T., Jiang D., Can W. 2008. Effects of High Temperature on Key Enzymes Involved in Starch and Protein Formation in Grains of Two Wheat Cultivars. *Journal Agronomy and Crop Science*. 194. 47-54.