



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CARACTERIZACIÓN DE PEROXIDASAS DE PARED CELULAR  
Y SU POSIBLE PARTICIPACIÓN EN EL ENDURECIMIENTO  
DEL FRIJOL.”**

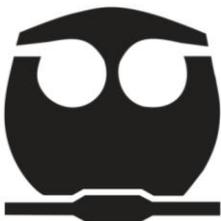
**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**JORGE ARMANDO VELÁZQUEZ REYES**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Resendiz Vázquez Bertha**

**VOCAL:**                 **Profesor: Bernal Lugo Irma Ofelia**

**SECRETARIO:**         **Profesor: Leal Lara Hermilo**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: Ávila Chávez Euclides**

**2° SUPLENTE:**         **Profesor: Conca Torres Armando**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 104 CONJUNTO "E" EDIFICIO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA. PASEO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, CIRCUITO INSTITUTOS. CIUDAD UNIVERSITARIA 04510, MÉXICO, D.F.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Dra. Carmen Jacinto Hernández**

**SUSTENTANTE:**

**Jorge Armando Velázquez Reyes**

## **Agradecimientos**

***A mi familia, a mi tía Isabel y mi tío Armando quienes son el corazón y la mente de la casa y que me han apoyado a lo largo de toda mi vida y han inculcado en mi, valores para hacer frente a las dificultades de cada día.***

***A mi hermano Rodrigo, a Carlos, Armando, Daniel y Pilar, por sus enseñanzas y lecciones de vida.***

***A la Dra. Irma Bernal Lugo por haberme dado la oportunidad de trabajar en el proyecto, por su paciencia y tiempo.***

***A los hermanos que pude elegir, Ernesto y Mitzy, que siempre han estado conmigo sin importar la distancia o las circunstancias.***

***A l@s compañer@s del laboratorio 104, por hacer más amenos esos largos días en el desarrollo de este trabajo.***

***Al Dr. Ismael Vázquez Alemán y a la Dra. Ma. Del Pilar Ortega Bernal por escucharme cuando más lo necesité.***

***A la B. Guadalupe Molina García, por sus atinadas sugerencias y aportaciones a este trabajo.***

***A los miembros del jurado por el tiempo dedicado y sus aportaciones durante la revisión de este trabajo.***

***A a Q. Laurel Fabila por su asistencia técnica en el área de equipo común en la realización de este trabajo.***

***A todos mis profesores, amigos y compañeros de la Facultad de Química por compartir sus experiencias y ampliar mi visión en mi misión como profesionista.***

***A la UNAM por la oportunidad de formarme profesionalmente.***

***A ti, que te llevarás algo de este trabajo, espero te sea útil.***

## ***Dedicatorias***

***A la memoria de los ausentes.***

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	4
2.1 Proceso de cocción	7
2.2 Endurecimiento	8
3. Hipótesis	10
4. Objetivos	10
4. 1. Obtención de semillas endurecidas de frijol de diversas variedades.	10
4.2. Definir el efecto del endurecimiento del frijol con la actividad de la peroxidasa.	11
4.3. Caracterización de la actividad de la peroxidasa de pared celular de cotiledones de frijol.	11
5. Metodologías	12
5.1. Material biológico	13
5.2. Endurecimiento de semillas de frijol	14
5.3. Determinación del tiempo de cocción	14
5.4. Extracción de proteínas	15
5.4.1. Obtención de harina	15
5.4.2. Extracción de enzimas de pared celular de cotiledón de frijol	15
5.5. Determinación de la actividad de peroxidasa	16
5.6 Cuantificación de proteína en extractos de pared celular de cotiledón	19
5.6.1 Método Lowry	19
5.6.2 Método Bradford	20
5.7. Purificación de proteínas	21
5.7.1. Precipitación con sulfato de amonio	21
5.7.2. Diálisis	23
5.7.3. Cromatografía de intercambio iónico	23

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
5.8. Análisis de proteínas	25
5.8.1 Electroforesis desnaturante en geles de acrilamida (SDS – PAGE)	25
5.8.2 Gel de Isoelectroenfoque (Zimogramas)	27
6. Resultados	31
6.1 Endurecimiento de frijol	31
6.2 Abundancia de proteína en la pared celular	35
6.3 Efecto del endurecimiento del frijol en la actividad de peroxidasa de pared celular.	36
6.4 Purificación de la peroxidasa de pared celular	38
6.5 Tercer experimento de purificación de peroxidasa	42
6.6 Caracterización de la peroxidasa purificada.	49
6.7 Actividad de la enzima con distintos sustratos	55
7. Discusión	56
8. Conclusiones	60
9. Perspectivas	61
10. Referencias	62
11. Apéndice	65
11.1 Obtención de harina de cotiledón de semillas de frijol.	65
11.2 Extracción de enzimas de pared celular de cotiledón de frijol.	66
11.3 Determinación de la actividad de peroxidasa.	69
11.3.1 Cinética POX vs. Pirogalol	69
11.3.2 Cinética POX Vs. Ácido ferúlico	70
11.3.4 Cinética POX Vs. Orto-Dianisidina	71
11.4 Cuantificación de proteína en extractos de pared celular de cotiledón.	72
11.4.1 Método Lowry	72

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
11.4.2 Método Bradford	73
11.5 Purificación de proteínas	74
11.6 Precipitación de proteínas con sulfato de amonio	77
11.7 Cromatografía de intercambio Iónico	78
11.8 Liofilización	79
11.9 Optimización del ensayo para la cuantificación de peroxidasa de pared celular	80
11.10 Geles de poliacrilamida	83

<b>Índice de figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Corte transversal de una semilla de frijol	7
Figura 2. Fotografía de microscopía óptica de varias células de cotiledón de frijol después del proceso de cocción	6
Figura 3. Cocinador Mattson	14
Figura 4. Reacción del pirogalol catalizada por la peroxidasa	17
Figura 5. Reacción catalizada por la peroxidasa utilizando Orto-Dianisidina como sustrato	19
Figura 6. Dispositivo para realizarla precipitación con sulfato de amonio	22
Figura 7. Diálisis de las proteínas de pared celular precipitadas con 90 % de saturación con sulfato de amonio.	23
Figura 8. Comparación del aspecto entre semillas frescas y endurecidas.	31-32
Figura 9. Tiempo de cocción para semillas almacenadas en condiciones inadecuadas.	33
Figura 10. Distribución de los Tiempos de cocción de la muestra de semillas frescas (A) y de las almacenadas inadecuadamente (B).	35
Figura 11. Perfil de elución del primer experimento de purificación de la columna de intercambio catiónico para extracto de enzimas de pared celular de frijol.	39

<b>Índice de figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 12. Perfil de elución del segundo experimento de purificación en columna de intercambio aniónico para un extracto de enzimas de pared celular de frijol.	41
Figura 13. Perfil de elución para enzimas de pared celular del tercer experimento de purificación con una columna de intercambio aniónico.	43
Figura 14. Perfil de actividad específica para fracciones eluidas en columna de intercambio aniónico.	44
Figura 15. Geles de PAGE-SDS 12%	45
Figura 16. Perfil de proteína detectado a 280 nm del cuarto experimento de purificación,	47
Figura 17. Gel de poliacrilamida 10% desnaturalizante para la purificación de algunas de las fracciones de la columna 4.	48
Figura 18. Electroforesis en gradiente de pH de la actividad de peroxidasa utilizando o-dianisidina como sustrato para revelar la actividad enzimática.	50
Figura 19. Zimograma de actividad de peroxidasa revelado con Orto - Dianisidina.	51
Figura 20. Tinción con azul de Coomasie del zimograma de la ilustración 4.	51
Figura 21. Ensayos enzimáticos de Peroxidasa de pared celular usando Acido ferúlico como sustrato.	53
Figura 22. Velocidad enzimática obtenida de los ensayos a distinta concentración de ácido ferúlico.	54
Figura 23. Gráfica de Lineweaver - Burk para calcular la $K_m$ y la $V_{max}$	54
Figura 24. Ensayo de actividad de peroxidasa con pirogalol como sustrato.	80
Figura 25. Cinética de Peroxidasa de pared celular de cotiledones de frijol.	81
Figura 26. Gel de poliacrilamida 12% con marcadores de PM	83
Figura 27. Gel de Poliacrilamida al 10% con marcadores de PM	84

<b>Índice de cuadros</b>	<b>Página</b>
Cuadro 1. Aporte nutricional por cada 100 g de semillas de frijol.	4
Cuadro 2. Variaciones en la composición de diferentes tipos de frijol.	5
Cuadro 3. Reactivos en el ensayo de peroxidasa, utilizando pirogalol como sustrato.	17
Cuadro 4. Reactivos en el ensayo de peroxidasa, utilizando ácido ferúlico como sustrato.	18
Cuadro 5. Reactivos en el ensayo de peroxidasa, utilizando o-dianisidina como sustrato.	19
Cuadro 6. Experimentos de cromatografía.	25
Cuadro 7. Composición de los geles de acrilamida desnaturalizantes.	26
Cuadro 8. Composición de los geles de acrilamida nativos.	28
Cuadro 9. Componentes y volúmenes para las soluciones de muestra y de sobre-muestra.	29
Cuadro 10. Esquema de corrida para gel de Isoelectroenfoque (IEF).	29
Cuadro 11. Ensayo para revelar actividad POX en el gel de IEF.	30
Cuadro 12. Tiempo de cocción de semillas de frijol frescas y almacenadas.	34
Cuadro 13. Efecto del endurecimiento de la semilla de frijol en la cantidad de proteína extraída de pared celular.	36
Cuadro 14. Actividad de POX aislada de pared celular.	37
Cuadro 15. Actividad de POX en pared celular.	38
Cuadro 16. Purificación de POX al utilizar una columna catiónica.	39
Cuadro 17. Purificación de POX al utilizar una columna aniónica	41-42
Cuadro 18. Cuadro de purificación para una columna aniónica	43
Cuadro 19. Pesos moleculares de las bandas del gel SDS-PAGE 12 %	46
Cuadro 20. Purificación de POX al utilizar una columna aniónica.	47
Cuadro 21. Pesos moleculares de las bandas del gel SDS-PAGE 10 %.	48
Cuadro 22. Actividad de peroxidasa de pared celular sobre distintos compuestos.	55

<b>Índice de cuadros</b>	<b>Página</b>
Cuadro 23. Ensayo POX- Pirogalol	70
Cuadro 24. Ensayo POX-Ácido Ferúlico.	71
Cuadro 25. Ensayo POX- O-Dianisidina.	72
Cuadro 26. Cantidades de sulfato de amonio requeridas para precipitación de proteínas.	78
Cuadro 27. Valores promedio de pendientes en ensayos de actividad de POX.	82

## **Resumen**

El endurecimiento de la semilla de frijol se produce cuando ésta se almacena en condiciones inadecuadas (humedad relativa (HR) > del 50 % y temperatura > 4 °C). Este problema se manifiesta por un incremento en el tiempo de cocción, con respecto al frijol recién cosechado o almacenado a 4 °C y humedad relativa inferior al 50%. A la fecha se ha reportado que el incremento del tiempo de cocción se debe a una disminución en la termosolubilización de los polisacáridos de la pared celular. Probablemente esto se debe a la formación de enlaces covalentes entre los polifenoles unidos a los polisacáridos de la pared celular. Estos enlaces covalentes podrían ser el producto de la reacción con peroxidasas, las cuales están presentes en la pared celular y activas durante el almacenamiento de la semilla, cuyas actividades han sido recientemente detectadas en nuestro laboratorio, por lo que, como propósito principal, este trabajo de tesis contempla la caracterización de las isoformas de peroxidasas presentes en la pared celular de las células de cotiledón de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Los parámetros que se determinarán para cada una de las isoformas serán el pI (punto isoeléctrico), el PM (peso molecular) y la especificidad por diversos sustratos. Lo anterior a su vez se logra mediante procesos de extracción y purificación por cromatografía de intercambio iónico, técnicas de electroforesis en gradiente de pH y la determinación de constantes cinéticas para diversos sustratos. Con los experimentos antes descritos se establece la participación de la peroxidasa en la susceptibilidad del frijol a endurecerse

cuando se almacena en condiciones inadecuadas. Además, una de las isoenzimas de peroxidasa presente en la pared celular del cultivar Bayo Mecentral utiliza ácido ferúlico como sustrato.

El proceso experimental se divide en dos fases: en la primera, las semillas se someten a almacenamiento en condiciones no favorables y se realizan las pruebas para determinar el nivel de endurecimiento de la semilla. En la segunda se realiza la extracción de las enzimas de la pared celular, se purifica el extracto y se detecta la actividad de las peroxidasas.

### ***1. Introducción.***

Las semillas de frijol deben someterse a un proceso de cocción para su uso como alimento, durante éste tienen lugar cambios fisicoquímicos que convierten a la semilla en una fuente importante de nutrientes para la mayoría de los estratos sociales. Este proceso de cocción consiste en dos fases principales: la primera es el remojo de las semillas, éstas se someten al remojo, con la finalidad de solubilizar compuestos hidrosolubles y reducir el tiempo de cocción. La segunda fase es la cocción donde la semilla se ablanda y adquiere las características de aroma, textura y sabor que son agradables para los consumidores. Es importante la adecuada cocción para evitar el efecto tóxico de ciertas sustancias presentes en las semillas, conocidos como factores antinutricionales, por ejemplo inhibidores de tripsina, compuestos cianogénicos, lectinas (Valle, 2000).

Cuando la semilla es almacenada de manera inadecuada ( $T > 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $\text{HR} > 50\%$ ) su tiempo de cocción se incrementa, respecto a la almacenada en condiciones óptimas ( $T < 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $\text{HR} < 50\%$ ). Es entonces que a las semillas almacenadas de manera inadecuada se les denomina endurecidas o deterioradas.

El ablandamiento de la semilla de frijol durante la cocción se debe, entre otros eventos, a la termo-solubilización de pectinas y a la pérdida de rigidez de las paredes de las células del cotiledón (Martínez y cols, 2011). Debido a que la estructura de los polímeros en la pared celular se mantiene, principalmente, por la interacción inter e intramolecular de puentes de hidrógeno, la energía requerida para el rompimiento de éstos durante la ebullición de la semilla, se ve reflejado en la magnitud de su tiempo de cocción. En el frijol endurecido, estos eventos se realizan con mayor dificultad, requiriendo de más energía y por ello su tiempo de cocción se incrementa. Esta dificultad podría ser consecuencia de las nuevas interacciones que se establecen entre los polímeros de la pared celular durante el almacenamiento inadecuado de la semilla de frijol. Evidencia que apoya esta propuesta es el hecho de que el peso molecular de las pectinas y el contenido de lignina detectados fue mayor en paredes celulares de frijol endurecido, que en el frijol control (Martínez y cols., 2011; Quezada, 2005). Lo anterior, podría deberse a la formación de enlaces éster entre los grupos feruilo esterificados a las cadenas de pectinas (Tintor, 2011; García y cols

1998) o por formación de enlaces di-isotirosina entre la proteínas estructurales de pared celular (Brady y cols., 1996). La consecuencia de alguno de estos enlaces covalentes o la de ambos, resultaría en una modificación de las características de termosolubilización de los polisacáridos. Para la formación de los enlaces covalentes antes mencionados, se requiere de una peroxidasa de pared celular actuando "in situ" durante el almacenamiento. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar y purificar la actividad de peroxidasa de pared celular y determinar el efecto en el almacenamiento inadecuado en la actividad de la misma.

## **2. Antecedentes**

El frijol es una rica fuente de proteínas e hidratos de carbono, además de ser una buena fuente de vitamina del complejo B como: la niacina, la riboflavina, la tiamina, y el ácido fólico. Igualmente proporciona hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio, magnesio y calcio; tiene un alto porcentaje de fibra. Si bien su contenido de lípidos es menos del 2 %; en los que predominan los ácidos grasos poli-insaturados (Yoshida y cols., 2005). En general cada 100 g de frijol proporcionan los nutrimentos especificados en el cuadro 1.

<b>Cuadro 1.</b> Aporte nutricional por cada 100 g de frijol.	
Humedad	9.71 g
Proteínas	29.95 g
Grasas	2.44 g
Almidón total	38.99 g
Cenizas	4.35 g
Granito, Guinand. (2006).	

Aunque diversos tipos de frijol presentan cierta variación en el contenido de los nutrimentos mayoritarios (Cuadro 2).

<b>Cuadro 2.</b> Variaciones en la composición de diferentes tipos de frijol.			
<i>Phaseolus vulgaris</i>	g/100 g base seca		
	Proteína cruda	Lípidos	Almidón
Negro	23.0	2.0	44.0
Pinto	25.6	1.5	51.0 – 56.5
Rojo	21.1 – 39.4	1.5	31.9 – 47.0
El – Tabey Shehata, (1992).			

El consumo de frijol resulta especialmente valioso como fuente de proteína en aquellas regiones donde la población tiene limitado acceso a la proteína de origen animal. Sin embargo, la proteína de esta leguminosa es deficiente en metionina pero rica en lisina (Morales de León, 2005), por lo que, para incrementar su valor nutritivo es necesario combinarla con proteínas que complementen sus deficiencias de aminoácidos esenciales. En las zonas rurales de México, el frijol se suele consumir con productos derivados del maíz, lo cual mejora la calidad de las proteínas de ambas semillas, ya que la proteína del maíz es rica en metionina y pobre en lisina (Morales de León, 2005).

El frijol también contiene factores anti-nutricionales, llamados así porque modifican el aprovechamiento de sus nutrimentos, tales como inhibidores de tripsina, hemaglutininas, saponinas y ácido fítico entre otros, algunos de los cuales son destruidos, al menos en parte, durante el tratamiento culinario (Serrano y Goñi, 2004).

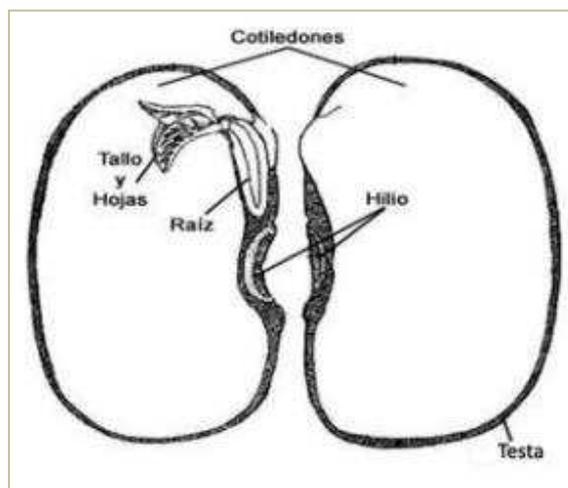
Debido a sus propiedades nutricionales y bajo costo, la semilla de frijol es fundamental en la dieta de la población en países de economía emergente como México. Pero, por su dureza y contenido de componentes antinutricionales, es necesario un tratamiento de cocción para eliminarlos y para que adquiera las características de textura y sabor exigidas por el consumidor. El tiempo que tarda el tratamiento térmico para que el frijol adquiera la textura y el sabor agradables al paladar se denomina **tiempo de cocción (TC)**. Este parámetro es el que determina la preferencia del consumidor y por tanto, su precio en el mercado. Debido a esto, algunas variedades de frijol son más populares que otras, ya que diversos cultivares de frijol presentan diferente tiempo de cocción. En frijol recién cosechado o almacenado a temperatura (T) menor de 4 °C y humedad relativa (HR) menor de 50 %, la semilla de frijol siempre presenta un tiempo de cocción menor, que cuando es almacenado en condiciones de alta temperatura y humedad relativa (Jacinto-Hernández y cols. 2002). Este fenómeno del incremento en el tiempo de cocción de la semilla del frijol por almacenamiento inadecuado, se denomina **endurecimiento** e influye de manera importante en la calidad nutricional y culinaria de las semillas, en la aceptación por el ama de casa, en su selección como materia prima de procesos industriales así como materia de exportación – importación.

Dado que el tiempo de cocción es el parámetro crucial para los diversos usos del frijol y éste se incrementa en el frijol endurecido, a continuación se

describen los cambios fisicoquímicos que se realizan en el frijol durante la cocción. Se proponen los probables cambios que durante el almacenamiento inadecuado se realizan en la semilla y que resultan en el incremento del tiempo de cocción de la semilla endurecida.

### **2.1 Proceso de Cocción.**

Durante la cocción del frijol, la semilla se suaviza, pierde toxicidad, adquiere las características sensoriales deseables, y aumenta su digestibilidad, lo cual se consigue gracias a los cambios fisicoquímicos que ocurren en los cotiledones de la semilla (Liu et al., 1995). En esta estructura de la semilla, que representa el 90 % de su peso (figura 1), el tratamiento térmico o cocción provoca cuatro cambios principales:

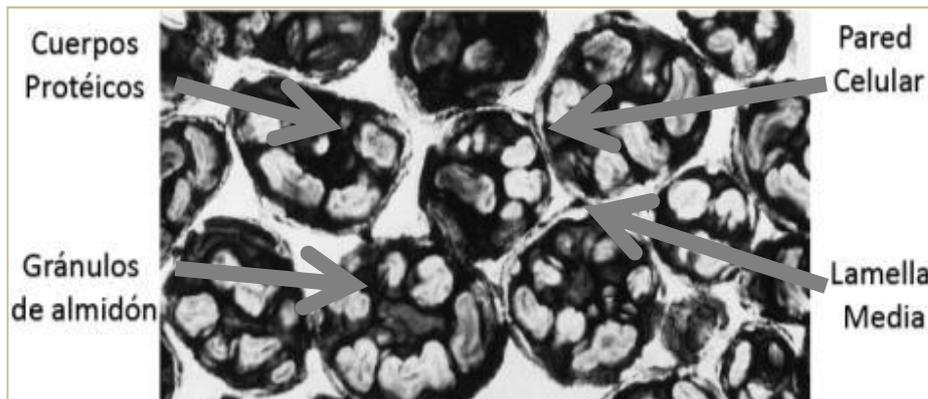


**Figura 1.** Corte transversal de una semilla de frijol.

- 1) Fractura y solubilización de la lamela media, separando las células adyacentes (Fig. 2);
- 2) disminución de la rigidez de la pared celular (Martinez y cols. 2011);  
en el citoplasma,

3) las proteínas se desnaturalizan;

4) los gránulos de almidón se gelatinizan (Bernal, 1994); como resultado, la semilla se suaviza y adquiere el sabor agradable al paladar.



**Figura 2.** Fotografía de microscopía óptica de varias células de cotiledón de frijol después del proceso de cocción (Noah-Guillon, 1998).

## **2.2 Endurecimiento.**

Como ya se mencionó, cuando la semilla de frijol es almacenada de manera inadecuada su tiempo de cocción se incrementa, respecto a la almacenada en condiciones óptimas, se dice que se ha endurecido. La velocidad con la que las semillas de frijol se endurecen depende de la HR y la temperatura del almacén, así como del periodo de almacenamiento (Liu, 1995) de donde se concluye que la HR y la temperatura constituyen los principales factores abióticos que inducen este problema.

Cuando los frijoles endurecidos se cuecen, los cambios fisicoquímicos en las proteínas y en el almidón se realizan con la misma facilidad que en los frijoles frescos (García-Vela y Stanley, 1989). Sin embargo, los cambios que

se termoinducen en la pared de las células del cotiledón son más difíciles de realizarse (Méndez, 2003). Probablemente esta dificultad se deba a un incremento en el número de enlaces covalentes en la pared celular de frijol endurecido respecto al control. Evidencia que apoya esta sugerencia son el incremento de ácido ferúlico y de lignina detectados en la pared celular aislada de frijol endurecido respecto del control (Tintor, 2010; Quezada, 2005; García y col. 1998). En la pared celular de los frijoles frescos, los grupos feruilo están unidos a las arabinosas que constituyen la cadena lateral de las fibras de pectinas (García y cols. 1998), por lo que sería posible que en las fibras de pectina del frijol endurecido formaran enlaces covalentes que resultarían en la unión de dos o más cadenas de pectinas, lo que incrementaría el PM de las pectinas y por tanto requerirían de mayor energía para ser solubilizadas; también podría suceder que las proteínas estructurales de las paredes celulares se entrecrucen a través de la oxidación de sus residuos de tirosina y en esta nueva interacción podrían atrapar fibras de pectina o hemicelulosa que dificultarían la pérdida de rigidez de la pared celular. Asumiendo que cualquiera de los eventos antes descritos o ambos podrían ser los responsables de que las semillas de frijol endurecido presenten mayor tiempo de cocción, el entrecruzamiento tanto de los grupos feruilo, como de los residuos de tirosina de proteínas estructurales requiere de la presencia de peroxidasa(s) en la pared celular.

### **3. Hipótesis**

Si la peroxidasa presente en pared celular (PC) de frijol utiliza ácido ferúlico como sustrato, entonces es probable que participe en el fenómeno de endurecimiento de la semilla a través de la formación de enlaces covalentes entre las pectinas, disminuyendo su termosolubilidad e incrementando la rigidez de la pared celular.

### **4. Objetivos**

Recientemente en el laboratorio se detectó la actividad de peroxidasa en pared celular de cotiledón de frijol (Tintor, 2011). Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido caracterizar parcialmente la actividad de peroxidasa de pared celular de frijol y determinar el efecto del endurecimiento de la semilla respecto a la actividad de esta enzima.

Para el logro del objetivo anterior se realizaron los siguientes sub-objetivos:

#### **4. 1. Obtención de semillas endurecidas** de frijol de diversas variedades.

- Almacenamiento de las semillas a 75 % de HR y 30 °C, por 75 días.
- Determinación del tiempo de cocción de las semillas después del período de almacenamiento.
- Comparar el tiempo de cocción de frijol fresco contra el almacenado en condiciones inadecuadas.

**4.2. Definir el efecto del endurecimiento** del frijol en la actividad de la peroxidasa.

- Cuantificar la actividad de peroxidasa de pared celular en frijol fresco y endurecido.

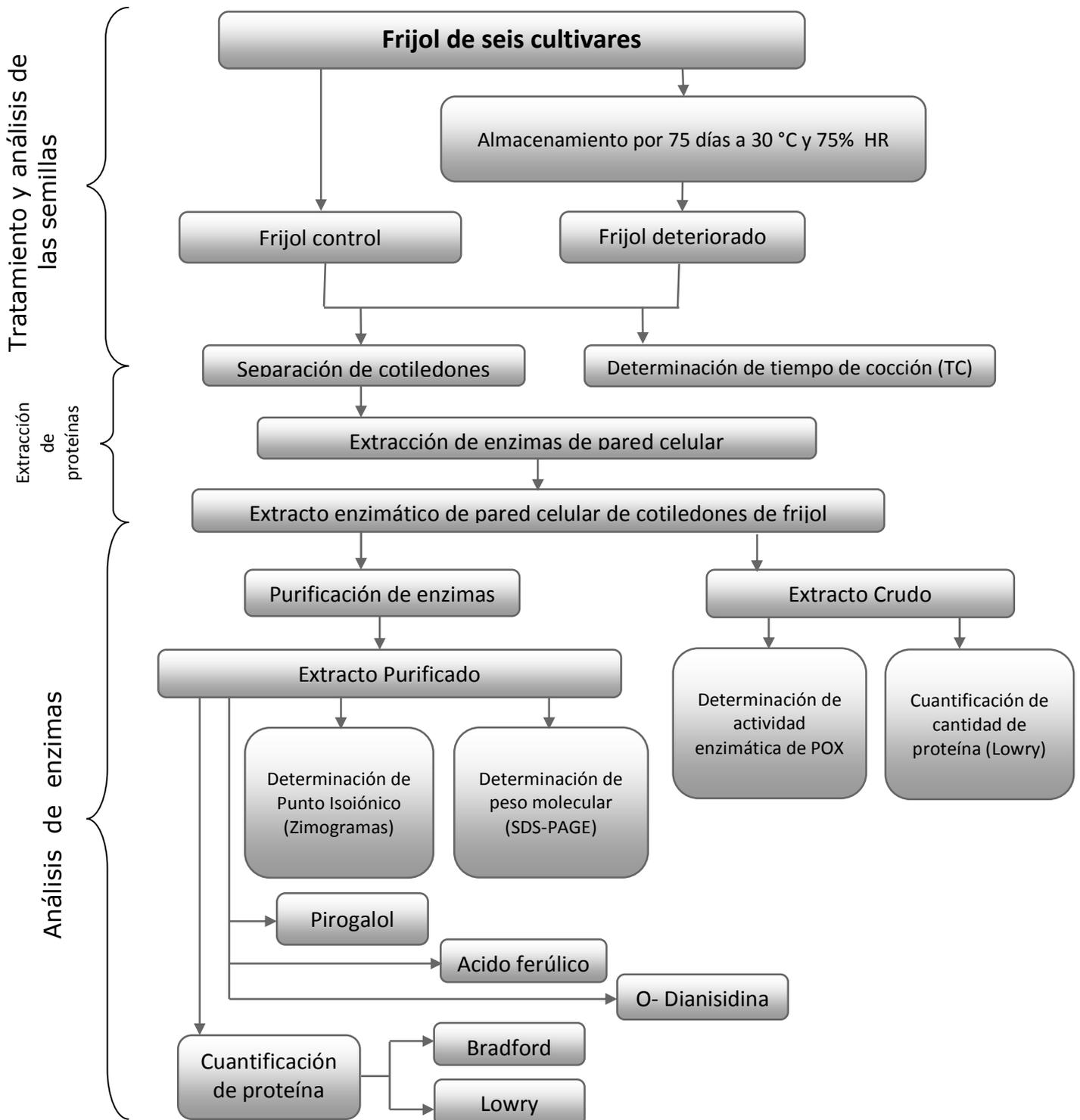
- Analizar la correlación entre sensibilidad al endurecimiento y actividad de peroxidasa.

**4.3. Caracterización de la actividad** de la peroxidasa de pared celular de cotiledones de frijol.

- Aislar y purificar por cromatografía de intercambio iónico, la actividad de peroxidasa de pared celular.

- En la(s) fracción(es) purificada(s), determinar los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ), el punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (PM) de la peroxidasa.

## 5. Metodologías



**Esquema 1.** Procedimiento para la obtención de frijol endurecido, extracción purificación y caracterización de peroxidasa de pared celular.

### **5.1 Material biológico**

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de distintos cultivares: INIFAP, Flor de Durazno (FD), Bayomex (BM), Negro Otomí (NO), Flor de Mayo Mam 38 (Mam 38) y Negro Jamapa (NJ). Las muestras de los distintos cultivares fueron crecidos en Sta. Lucia Texcoco, cosechados en el ciclo primavera verano del año 2009 y donados por CEVAMEX-INIFAP. Desde la cosecha fueron almacenadas a una temperatura menor a los 10 °C y una humedad relativa por debajo del 50%.

### **5.2 Endurecimiento de las semillas de frijol**

Con el objetivo de endurecer las semillas de frijol, éstas se almacenaron durante 75 días, en un recipiente de cierre hermético conteniendo una solución sobresaturada de cloruro de sodio (39.2 % p/p), la cual proporciona una humedad relativa del 75 %. El recipiente con las semillas se cerró y se colocó a 30 °C en una Incubadora (Lab-Line modelo imperial III). Después de este periodo, las semillas se almacenaron a 4°C en frascos de vidrio tapados.

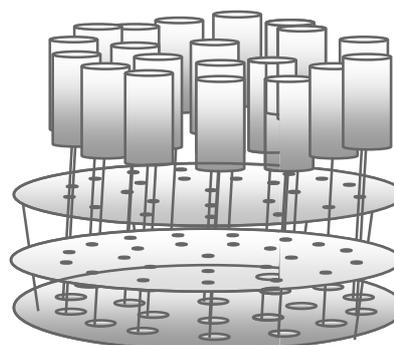
### **5.3 Determinación del tiempo de cocción ( $T_{C50}$ )**

Para determinar los tiempos de cocción ( $T_{C50}$ ) de las semillas de frijol, se empleó un cocinador tipo Mattson, el cual consiste en una estructura metálica con cavidades que detienen a los frijoles (Fig. 3A). Éstos se mantienen en su lugar a través de unas varillas colocando una pesa de 200 g sobre cada varilla (Fig. 3B). Esta estructura de metal conteniendo las semillas

y las varillas, se introdujo en una "cámara de cocción" (olla de aluminio), la cual contenía agua desionizada hirviendo, y se mantuvo en ebullición mediante un mechero Fisher de gas, se agregó agua hirviendo, conforme se evaporaba, para mantener el nivel. Cuando una semilla se coció, ésta fue atravesada por la varilla debido a la pérdida de dureza de la misma. Se registró el tiempo que cada una de las semillas tardó en ser atravesada por la varilla. Esta información se graficó, considerando como la ordenada, el porcentaje de semillas que fueron atravesadas por la varilla y como la abscisa el tiempo que tardó la varilla en atravesar cada porcentaje de semillas. Por interpolación en las gráficas anteriores se calculó el tiempo que tardaron en cocerse el 50 % de las semillas, y se consideró como el tiempo de cocción medio ( $TC_{50}$ ).



**A**



**B**

**Figura 3.** Cocinador Mattson.

## **5.4 Extracción de proteínas**

### **5.4.1 Obtención de harina de cotiledón de frijol.**

Debido a que los cotiledones son una matriz compleja de proteínas y carbohidratos, fue necesario aumentar la superficie expuesta de dicha matriz al solvente de extracción. Por lo que, para poder extraer las enzimas de la pared celular de manera eficiente se redujo el tamaño de partícula. Como primer paso se separó la testa de los cotiledones (ya que en la testa se pueden encontrar compuestos fenólicos, capaces de inactivar enzimas que son de nuestro interés), partiendo a la mitad el grano con la ayuda de una navaja, con la misma se eliminaron restos de testa en los cotiledones y el eje embrionario. Después de haber separado los cotiledones, se preparó la harina de cotiledón para cada uno de los cultivares. Para dicha tarea, se empleó una licuadora de laboratorio (Waring laboratory blender model 34BL97), el cual se operó en periodos de 3 min en la velocidad 7 a 4°C con el fin de que el aparato no se calentase y afectara a las enzimas del grano. Una vez obtenidas las harinas, se tamizaron en un cedazo de 425 micras. La harina tamizada se almacenó a -70 °C [Apéndice, esquema 1].

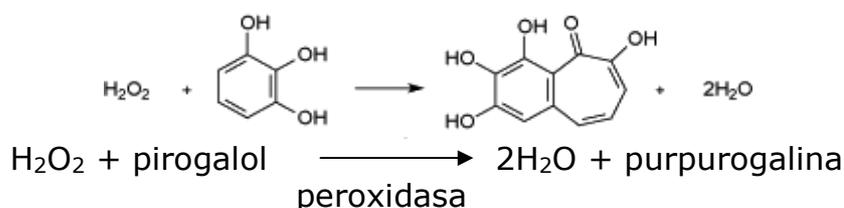
### **5.4.2 Extracción de enzimas de pared celular de cotiledón de frijol.**

Para la extracción de las enzimas de pared celular, se colocaron 0.25 g de la harina de cotiledón en un mortero y se le adicionó nitrógeno líquido, una vez que se evaporó, la harina congelada se homogeneizó y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 25 ml, agregando 10 ml de solución amortiguadora de

acetato de sodio 50 mM, pH 5.5, conteniendo 0.2 mM de PMSF (AP) y se agitaron durante 30 min a 4 °C, posteriormente se centrifugaron a 9234 g a 4 °C durante 15 minutos. La pastilla se re-suspendió en 10 ml de amortiguador AP. Se agitó durante 30 min a 4 °C y de nueva cuenta se centrifugó a 9234 g a 4°C durante 15 minutos. La pastilla se re-suspendió en 10 ml de amortiguador AP conteniendo NaCl 1M. Esta suspensión se mantuvo en agitación por 90 minutos a 4 °C. Pasado ese tiempo, los extractos se centrifugaron a 9234 g a 4 °C, durante 15 minutos y el sobrenadante (10 ml) se colocó en bolsas de diálisis (permite el paso de moléculas entre 6000-8000 Da) lavadas previamente con 1mM de EDTA. Las bolsas de diálisis se sumergieron en 4 litros de solución amortiguadora de acetato de sodio 0.05 M, pH 5.5; y el amortiguador se cambió tres veces. Los dos primeros cada 45 min, quedando el tercer cambio hasta el siguiente día. Después de la diálisis, las muestras de cada cultivar, se centrifugaron durante 15 minutos a 9234 g, los sobrenadantes se etiquetaron y almacenaron a 4 °C. Esta solución enzimática se utilizó como fuente de actividad de peroxidasa de pared celular [Apéndice, cuadro 23]

### ***5.5 Determinación de la actividad de peroxidasa.***

La reacción utilizada para la cuantificación de peroxidasa, en el extracto crudo, cuando se utilizó pirogalol como sustrato se muestra en figura 4. La formación de purpurogalina, complejo amarillo café, se cuantificó espectrofotométricamente, cada 10 seg, durante 10 min.



**Figura 4.** Reacción del pirogalol catalizada por la peroxidasa.

Cuadro 3. Reactivos en el ensayo de peroxidasa, utilizando pirogalol como sustrato.			
Reactivos*	Concentración stock	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final
Agua	--	400	-
Amortiguador de fosfatos pH=5.8	100 mM	100	10 mM
$\text{H}_2\text{O}_2$	0.5%	200	0.1 % (29 mM)
Pirogalol	5%	100	0.5 %
Disolución de enzimas	--	200	---

\* Con excepción del amortiguador todas las soluciones deben ser frescas y mantenidas en la oscuridad.  
 Leer el incremento de absorbancia a 420 nm, tomando lectura cada 10 segundos, durante 10 min.  
 Coeficiente de extinción =  $2640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $0.002640 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Sigma (1994).

En una celda de plástico de 1.5 ml se añadió el buffer, el peróxido y el pirogalol, en las cantidades indicadas en el cuadro 3, se mezclaron por inversión, tapando previamente la boca de la celda con un pedazo de papel plástico. La celda se colocó en el espectrofotómetro (Shimadzu UV-visible UV-1601) ya ajustado a cero con el amortiguador de fosfatos y se esperó hasta que la absorbancia del pirogalol se estabilizó. Una vez estabilizada la mezcla de los sustratos, se agregó 0.200 ml de extracto enzimático, previa optimización del ensayo (apéndice Fig.24 y Fig. 25), se mezcló nuevamente por inversión y se inició el cronómetro para medir el incremento en la absorbancia que la oxidación de pirogalol a purpurogalina se iba produciendo.

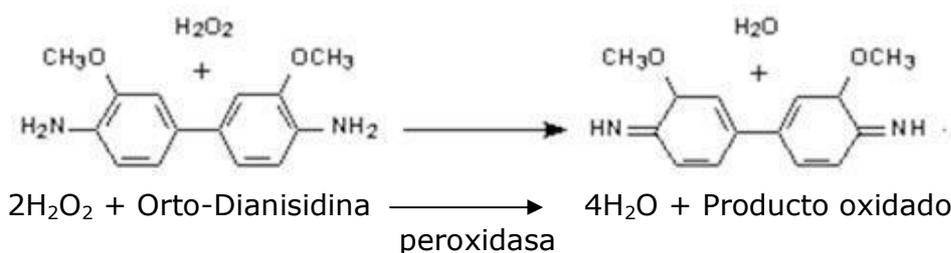
Las lecturas se hicieron cada 10 seg durante 10 min. Cuando este sustrato se utilizó para determinar la actividad de la enzima purificada se utilizaron sólo 0.030 ml de enzima y se ajustó a 1 ml el volumen de agua.

**Para determinar la actividad de peroxidasa purificada también se utilizó el ácido ferúlico como sustrato.** Este compuesto se usó para emular la posible acción de la enzima peroxidasa sobre los fenoles unidos a la pared celular (Tintor, 2011) y más específicamente, a las pectinas de las semillas de frijol (García y cols. 1998). El ensayo consistió en cuantificar a 310 nm el consumo de ácido ferúlico debido a la formación de aductos oxidados (cuadro 4, apéndice cuadro 24).

<b>Cuadro 4.</b> Reactivos en el ensayo de peroxidasa, utilizando ácido ferúlico como sustrato.			
Reactivos *	Concentración stock	Volumen (µL)	Concentración
Agua	---	670	-
Amortiguador fosfatos pH=5.8	100 mM	100	10 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 mM	100	0.5 mM
Ácido ferúlico	2.5 mM	100	0.25 mM
Disolución de enzimas	---	30	--
* Preparar todos los reactivos el mismo día del ensayo enzimático, excepto el buffer. Leer el decremento de absorbancia a 310 nm, tomando lectura cada 30 segundos. Coeficiente de extinción = <b>14.7</b> mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> , <b>0.0147</b> µM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> . Sánchez & Peña (1996).			

Un tercer sustrato utilizado para cuantificar la actividad de la peroxidasa de pared celular fue la o-dianisidina (cuadro 5, apéndice cuadro A3). Este sustrato se utilizó porque su producto oxidado es de poca solubilidad y

colorido (Figura 5). Esto permite que la o-dianisidina se emplee para detectar la actividad enzimática en geles.



**Figura 5.** Reacción catalizada por la peroxidasa utilizando Orto-Dianisidina como sustrato.

**Cuadro 5.** Reactivos en el ensayo de peroxidasa, utilizando o-dianisidina como sustrato.

Reactivos*	Concentración stock	Volumen (μL)	Concentración final
Agua	--	550	-
Fosfato de sodio pH 6.0	100 mM	100	10 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.9 mM	50	0.015 mM
O-Dianisidina	1 %	100	0.1 mM
Disolución de enzimas		200	-

\* Preparar todos los reactivos el mismo día del ensayo enzimático, excepto el buffer  
 Leer el incremento de absorbancia a 460 nm, tomando lectura cada 30 segundos  
 Coeficiente de extinción = **11.3** mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, **0.0113** μM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Liu & Lamport. (1974).

## 5.6 Cuantificación de proteína en extractos de pared celular de cotiledón.

### 5.6.1 Método Lowry

La cantidad de proteína en los extractos enzimáticos de pared celular de cotiledón de frijol se determinó mediante el método de Lowry (1951)

modificado, el cual resulta ser un método que no requiere gran cantidad de muestra, por su reproducibilidad y porque tiene gran sensibilidad.

Disoluciones:

- Disolución A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%, NaOH 0.4%, tartrato de sodio y potasio 0.16% y SDS 1%).
- Disolución B ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  4%).
- Reactivo de Follin (Sigma).
- Disolución de enzimas.

En tubos de ensaye se colocan 1 ml de disolución C (mezcla de disolución A y disolución B en proporción de 100:1, recién preparada), 0.15 ml de agua destilada y 0.2 ml del extracto enzimático de frijol. Se incubaron 10 min a temperatura ambiente y se agregaron 0.1 ml de reactivo de Follin, se incubó por 30 min a temperatura ambiente. El color desarrollado se cuantificó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-visible UV-1601) a 660 nm. Siguiendo la misma metodología se preparó una curva estándar con una disolución de Albúmina seica de bovino (BSA) (1 mg/ml) dentro de un intervalo de 0 – 100  $\mu\text{g}$ .

### **5.6.2 Método Bradford**

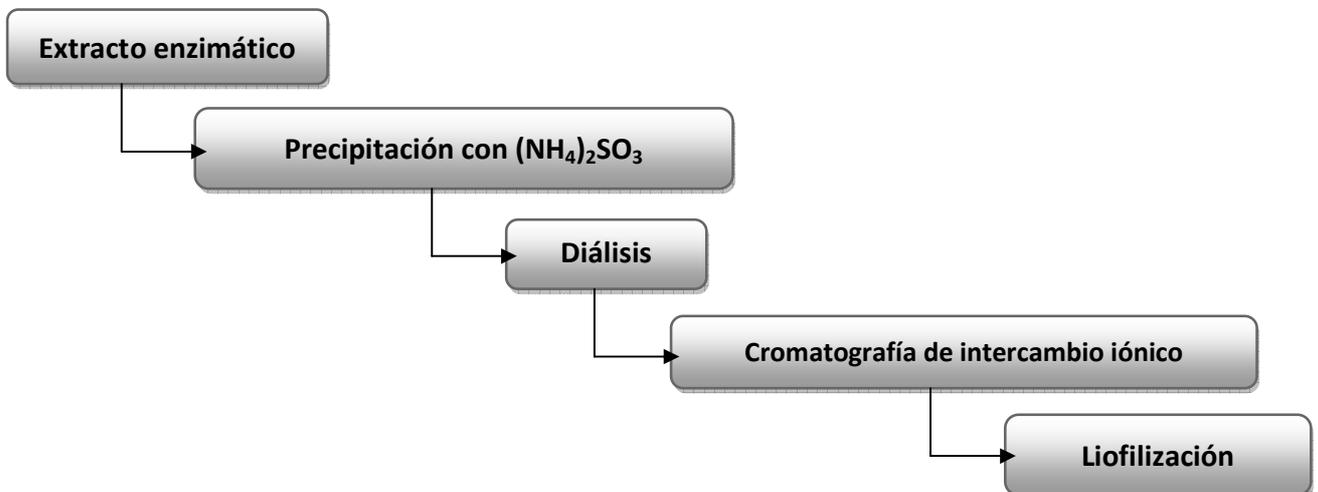
El método Bradford (Bradford, 1976) resulta ser más práctico en cuanto al menor número de los reactivos que se emplean y del tiempo que requiere el ensayo. El método es sensible, reproducible y resulta ideal para cuantificar

la cantidad de proteína en las fracciones obtenidas de la columna de intercambio iónico.

En tubos de ensaye limpios, se colocaron 0.75 ml de agua desionizada, 0.05 ml de muestra a analizar, 0.2 ml de reactivo de Bradford (Bio-Rad), se mezclaron por inversión, después de 5 minutos en reposo, el ensayo se vertió a celdas de plástico; la absorbancia se leyó a 595 nm (Shimadzu UV-visible UV-1601). La cantidad de proteína se calculó de acuerdo a la curva patrón realizada con seroalbúmina de bovino de 0-20  $\mu\text{g}$ .

### **5.7 Purificación de proteínas**

El esquema seguido para la purificación de las peroxidasas de pared celular:

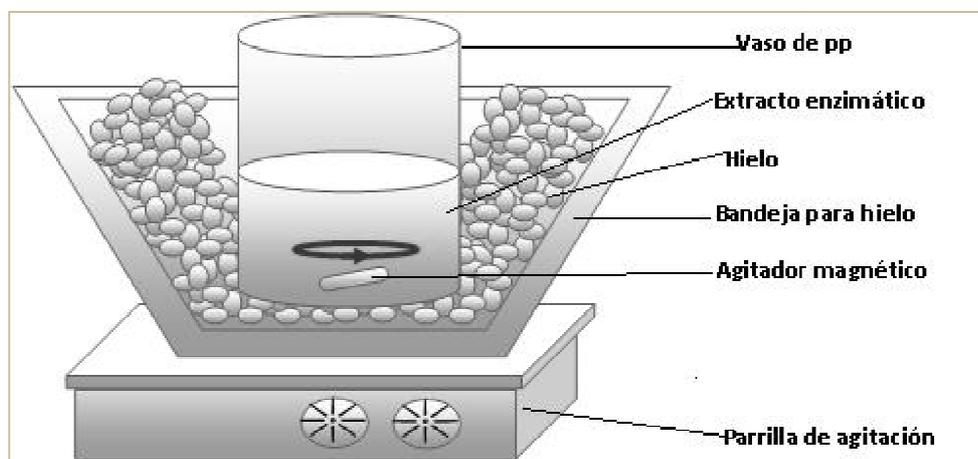


**Esquema 2.** Procedimiento para la purificación de peroxidasa de PC.

#### **5.7.1 Precipitación con sulfato de amonio**

Las peroxidasas precipitan entre 35 % a 90 % de saturación de sulfato de amonio (Dange y Reddy, 1984) y esta fue la concentración utilizada para

purificar la peroxidasa. Del extracto enzimático de pared celular, 44 ml se colocaron en el vaso de precipitados de la figura 6 y se agitaron lentamente.



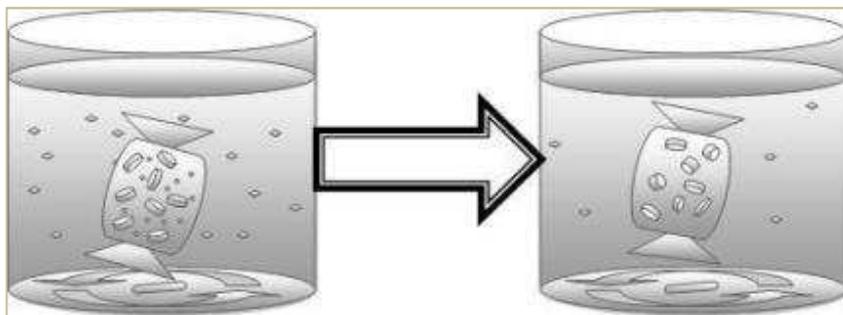
**Figura 6.** Dispositivo para realizarla precipitación con sulfato de amonio

De acuerdo al cuadro 26 del apéndice, la cantidad de sulfato de amonio requerida para que este volumen quedase al 35% fue de 8.53 g, los cuales se agregaron lentamente y en pequeñas porciones, dejando que cada porción se disolviera antes de agregar la siguiente. Una vez que se agregó y disolvió todo el sulfato calculado, el sistema se dejó en agitación en el baño de hielo durante una hora. Posteriormente se centrifugó a 13297 *g* durante 10 minutos a 4°C. La pastilla se desechó y el volumen del sobrenadante se midió. El volumen obtenido fue de 46 ml. El cuadro 26 del apéndice, indicó que la cantidad de sulfato de amonio para que la solución al 35 % de saturación llegara al 90% de saturación se debían agregar 16.97 g de sulfato de amonio. Éste se pesó y se agregó en la misma forma que se detalló anteriormente, se agitó durante una hora a 4 °C. Como paso final en esta

etapa se centrifugó a 13297 *g* durante 10 minutos a 4°C. Esta vez se colectó la pastilla y se resuspendió en 5 ml de amortiguador.

### 5.7.2 Diálisis

Después de re-suspender, el extracto se dializó en membranas de celulosa (Spectra/Por® corte de peso molecular 6000-8000 Da), haciendo tres cambios de buffer de Tris-HCl 20 mM pH 7.5 cada 45 minutos, con la finalidad de eliminar el sulfato de amonio del paso previo (Fig 7).



**Figura 7.** Diálisis de las proteínas de pared celular precipitadas con 90 % de saturación con sulfato de amonio.

### 5.7.3 Cromatografía de intercambio iónico

Para separar las peroxidasas básicas de las ácidas se empleó la cromatografía de intercambio iónico.

Como primer ensayo con esta técnica de separación se empleó una resina de intercambio catiónico con un volumen de columna de 5 ml, la cual se lavó con 5 volúmenes (25 ml) de agua destilada y se equilibró con 20 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 5.5. Para las fracciones de la columna se utilizó un colector automático programado para recibir 25 gotas, aproximadamente 2.5 ml. Para eluir la proteína que no interaccionó con la

resina, la columna se lavó con 10 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 5.5. La proteína unida a la columna se eluyó a diferentes concentraciones de NaCl: 0.25M, 0.50M, 0.75M, 1.0M y 1.5M en el amortiguador de acetatos antes mencionado. De cada concentración de NaCl se agregaron 2.5 ml en la columna, se tuvo cuidado de agregar la solución con la siguiente concentración de NaCl, hasta que hubiera eluído completamente la anterior. Se colectaron las fracciones y los resultados de este experimento se muestran en la figura 11.

Posteriormente se trabajó con resina de tipo aniónico (DEAE-Sephacell, Amersham Pharmacia). Para lo cual se preparó un nuevo extracto enzimático, y se empacaron 6.5 ml de la resina aniónica y se equilibró con solución amortiguadora de tris-HCl 20 mM a pH 7.5. Para las fracciones se utilizó un colector automático BioRad, el cual se ajustó para recoger fracciones de 3 ml. Las fracciones se recolectaron desde que se agregó a la columna 5 ml de solución amortiguadora, posteriormente los 3 ml de muestra seguidos de 10 ml de amortiguador tris-HCl 20 mM, pH 7.5, a continuación, la columna se lavó con 60 ml de un gradiente continuo de cloruro de sodio de 0 - 0.5 M. Estas soluciones se prepararon en el amortiguador de Tris-HCl 20 mM. Las fracciones obtenidas se leyeron a 280 nm y en las que se detectó proteína, se determinó la actividad enzimática de peroxidasa (cuadro 3).

Se realizaron dos experimentos más de cromatografía de intercambio iónico, donde lo que varió fue la fuerza del gradiente y la cantidad de proteína

aplicada en la columna (cuadros 17 y 18). En el cuadro seis se resumen las condiciones de las cromatografías realizadas.

<b>Cuadro 6. Experimentos de cromatografía.</b>						
Columna	Características de la resina	Volumen de la columna	Fase móvil	Volumen fracciones	Gradiente NaCl	Muestra
1	Catiónica. Macro Prep High-S-Support BioRad	5 ml	Acetato de sodio 50 mM, pH= 5.5	2.5 – 3 ml	Gradiente escalonado 0.25M, 0.50M, 0.75M, 1.0M y 1.5M	Vol. 2 ml Prot. 90.4 µg
2	Aniónica DEAE-Sepharose Amersham Biosciences	6.5 ml	Tris- HCl, 20 mM, pH=7.5	2 ml	Continuo 0 – 0.5M	Vol. 3 ml Prot. 2.18 mg
3	Aniónica DEAE-Sepharose Amersham Biosciences	5 ml	Tris- HCl, 20 mM, pH=7.5	1.5 ml	Continuo 0 – 0.25M	Vol. 3 ml Prot. 3.5 mg
4	Aniónica DEAE- Sepharose Amersham Biosciences	5 ml	Tris- HCl, 20 mM, pH=7.5	1.5 ml	Continuo 0 – 0.25M	Vol. 4.45 ml Prot. 3.5 mg

## 5.8 *Análisis de proteínas.*

### 5.8.1 **Electroforesis desnaturizante en geles de acrilamida (SDS – PAGE)**

El peso molecular de las enzimas se determinó por electroforesis en geles de PAGE-SDS (Laemmli, 1970). Se utilizó un gel separador al 10% o al 12 % y el concentrador fue al 4% de acrilamida, de acuerdo a las especificaciones del cuadro siete.

<b>Cuadro 7.</b> Composición de los geles de acrilamida desnaturalizantes.			
	Gel separador 10 % (ml)	Gel separador 12% (ml)	Gel concentrador 4 % (ml)
Agua	2.27	3.54	3.67
Acrilamida 30 % y bis 0.8 %	1.66	2.40	0.66
Amortiguador de Tris-HCl	( 2 M, pH 8.8) 1.00	( 2M, pH 8.8) 1.00	( 0.5 M pH 6.8) 0.60
SDS 10%	0.10	0.10	0.10
Mezclar y desgasificar por lo menos 15 min.			
PSA* 10%	0.050	0.050	0.050
TEMED	0.005	0.005	0.005
*Persulfato de amonio recién preparado			

Los marcadores de peso molecular (250 - 10 kDa) utilizados fueron marca BioRad. Para llevar a cabo la electroforesis se utilizó un sistema Mini Protean II de BioRad. El sistema se ensambló de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El cual consiste en:

- Armar con forma de un sándwich colocando las placas de vidrio y los espaciadores de 1 mm en el soporte.
- Mezclar los componentes del gel separador y desgasificar la mezcla antes de agregar los compuestos polimerizantes (Persulfato de amonio y TEMED).
- Mezclar suavemente y verter con pipeta en el sándwich ensamblado, agregar 1 ml de etanol para que se forme un borde liso en el gel y que la mezcla no tenga contacto con el aire.
- Mientras polimeriza, mezclar los componentes del gel concentrador y desgasificar.

- Cuando el gel separador haya polimerizado, eliminar el etanol del sándwich, lavar la superficie con un poco de amortiguador de tris pH 8.8 y eliminar.
- Agregar el persulfato de amonio y TEMED a la mezcla del gel concentrador. Mezclar suavemente y verter en el sándwich, insertar el peine para que tomen forma los pozos para colocar las muestras.
- Esperar a que polimerice el gel.

Cuando el gel está listo, se coloca en la cámara de electroforesis y se vierte en ella el buffer de corrida y se aplican las muestras en cada pozo. Se conecta a la fuente de poder y se aplican 10 mA, mientras la muestra recorre el gel concentrador y luego la corriente se cambia a 20 mA, mientras la muestra recorre el gel separador.

### **5.8.2 Gel de Isoelectroenfoque (Zimogramas)**

Con el fin de determinar el punto isoeléctrico (pI) de las isoenzimas de POX de pared celular de frijol, se elaboraron geles con anfolinas para lograr un gradiente de pH. Debido a que la detección de las enzimas se hace por actividad, de aquí en adelante estos geles se denominarán zimogramas. Cuando se aplica corriente eléctrica a los geles, la proteína, que posee su propia carga, migra hasta alcanzar una zona de pH en la cual su carga neta es cero y ahí precipita. Dicha zona en el gel está dada por las anfolinas, que son diversas especies de iones orgánicos que aportan carga al medio en que

se colocan. Para la preparación de estos geles, es necesario contar con soluciones madre de glicerol al 50%, acrilamida al 30% conteniendo bis-acrilamida 0.8 %, y anfolinas al 20% pH 3-10.

El gel de poliacrilamida (Cuadro 8) se polimeriza durante 60 min a 36 °C. En estas condiciones el gel polimeriza de manera homogénea y rápida.

<b>Cuadro 8.</b> Composición de los geles de acrilamida nativos.	
Reactivo	Gel separador (ml)
Agua	4.61
Acrilamida-bis	1.33
Glicerol (50%)	1.60
Anfolinas (pH 3-10)	0.40
Mezclar y desgasificar por lo menos 15 min.	
PSA* 10%	0.060
TEMED	0.006
*Persulfato de amonio recién preparado	

Una vez polimerizado, en los pozos del gel se coloca solución de sobre-muestra (cuadro 9), esto con la finalidad de aislar el gel con anfolinas del buffer del cátodo. Posteriormente, se pre-corre a 88 V durante 75 min, al término de este paso, se cambia el buffer del cátodo por buffer fresco y también se enjuagan los pozos. Después se aplica la muestra (1.0-30.0 U) y la solución de sobre-muestra, en ese orden y en los pozos correspondientes.

<b>Cuadro 9.</b> Componentes y volúmenes para las soluciones de muestra y de sobre-muestra.	
Composición de amortiguador de carga o Solución de muestra	
Reactivo	Volumen (µL)
Agua	860
Glicerol (99%)	100
Anfolinas (pH 3-10)	40
Composición de la solución de sobre-muestra	
Reactivo	Volumen (µL)
Agua	910
Glicerol (99%)	50
Anfolinas (pH 3-10)	40
<b>Nota:</b> la solución de muestra se mezcla con el extracto enzimático a analizar y la solución de sobre-muestra se coloca encima de la mezcla antes mencionada para aislar la misma del buffer del cátodo. Asimismo se debe calcular el volumen de cada componente para que el volumen del pozo sea suficiente.	

Para correr las muestras en el gel de anfolinas se aplica el esquema de corriente, detallado en el cuadro 10. Todas las manipulaciones para este tipo de electroforesis se realizaron a 4 °C.

<b>Cuadro 10.</b> Esquema de corrida para gel de Isoelectroenfoque (IEF)	
Corriente (Volts)	Tiempo (min)
88	75
Cambiar la solución amortiguadora del cátodo, enjuagar pozos y cargar muestras.	
96	30
120	30
138	30
156	30
180	30
<b>Sistema de Buffers</b>	
Solución amortiguadora cátodo	Solución amortiguadora ánodo
Etilendiamina 10 mM pH 10	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.5 M pH 3

Posterior a la corrida, se tomó una porción del gel de 1.5 cm (~ dos carriles) de ancho para medir el gradiente de pH. El resto del gel se enjuagó con agua desionizada para retirar algún resto de acrilamida y las anfolinas. Luego, el gel se sumerge en una solución de revelado conteniendo los reactivos descritos en el cuadro 11. Para obtener estas condiciones, se realizan varios experimentos en los que se varía tanto la concentración de o-dianisidina, el tipo de amortiguador, el tiempo de revelado y las unidades de actividad en el gel.

<b>Cuadro 11.</b> Ensayo para revelar actividad POX en el gel de IEF		
	Volumen (ml)	Concentración final
Amortiguador de fosfato de sodio 100 mM, pH 6	25 ml	33 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 mM	25 ml	3.3 mM
O-Dianisidina 20 mM	25 ml	6.6 mM

Para medir el gradiente de pH en el gel, la porción separada para ello, se corta en fragmentos continuos de un centímetro. Cada fragmento, se coloca en tubos limpios y etiquetados con la respectiva porción del gel, se agrega 1 ml de agua Mili-Q y se agita durante 2 min. Después, el pH de la solución en cada tubo se mide con un potenciómetro.

## 6. Resultados

### 6.1 Endurecimiento de frijol.

Para obtener frijol endurecido, las semillas frescas de los diversos cultivares se almacenaron a una humedad relativa de 75 % y 30 °C, durante 75 días. Se ha demostrado que estas condiciones de almacenamiento son propicias para que se presente el fenómeno de endurecimiento en las semillas de frijol, así como en otras leguminosas (Tintor, 2011; Liu, 1995; Reyes Moreno y Paredes-López, 1993). Como se esperaba, en la figura 8 se puede observar que las muestras con 75 días de almacenamiento muestran signos de deterioro, ya que una manifestación visible de este fenómeno es el cambio en el color de la testa.

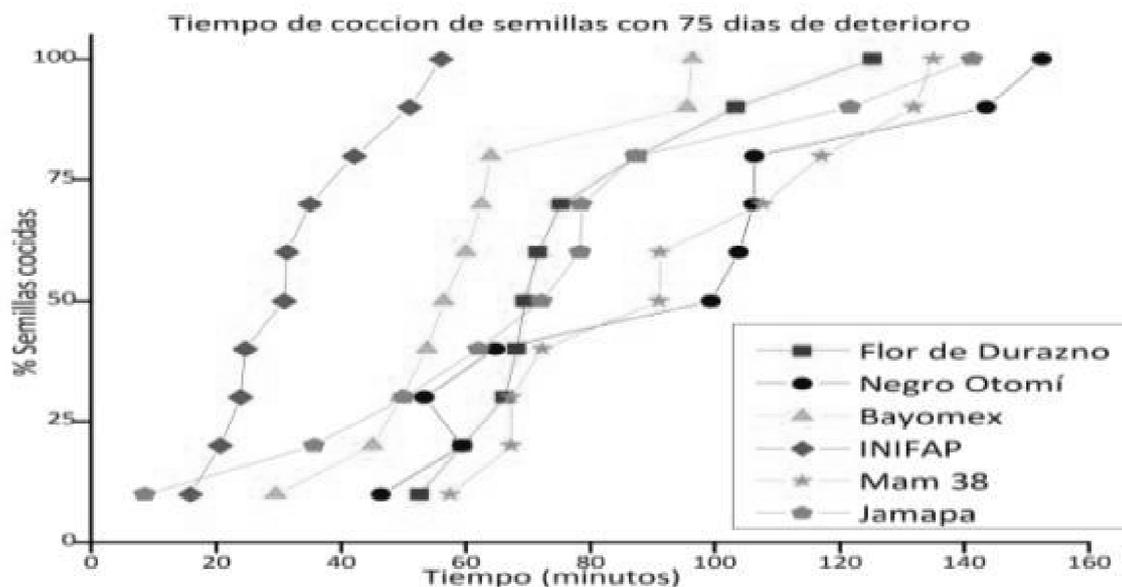
<b>Figura 8.</b> Comparación del aspecto entre semillas frescas y endurecidas.		
Semillas frescas	Semillas endurecidas	Interpretación
<p>Negro Otomí</p> 		<p><b>Negro Otomí (NO)</b> Las semillas se notan brillantes, con un leve incremento en tamaño.</p>
<p>Flor de Durazno</p> 		<p><b>Flor de Durazno (FD)</b> En este cultivar resalta el cambio de color en la testa que tuvo lugar durante el mal almacenaje.</p>
<p>INIFAP</p> 		<p><b>INIFAP (INI)</b> Solo algunas de las semillas tuvieron un cambio de color en la testa, De forma general, se nota brillo y cierto incremento de tamaño.</p>

<b>Figura 8.</b> Comparación del aspecto entre semillas frescas y endurecidas.		
Semillas frescas	Semillas endurecidas	Interpretación
<p>Negro Jamapa</p> 		<p><b>Negro Jamapa (NJ)</b> El brillo y el aumento en la intensidad de color son destacables en las semillas que recibieron el tratamiento en este cultivar.</p>
<p>Bayomex</p> 		<p><b>Bayomex (BM)</b> Algunas de las semillas de este cultivar presentan un cambio de color más intenso, pero en general todas las semillas tuvieron un cambio marcado en este atributo.</p>
<p>Mam 38</p> 		<p><b>Flor de mayo Mam 38 (Mam 38)</b> El cambio de color y el incremento de tamaño de las semillas fue más notable en este cultivar</p>

Los cultivares de color beige, INIFAP, FD, BM, MAM 38, se tornaron de color café; mientras que las variedades de color negro, NO y NJ, el color negro se tornó más brillante (Figura 8). Los cambios anteriores se deben a que durante el almacenamiento de la semilla de frijol, ocurre un fenómeno conocido como oscurecimiento. En el cual participan los fenoles de la testa y una enzima llamada polifenoloxidasas, provocando el cambio de pigmentación de la testa (Chang, 1990). También se detectó que después del almacenamiento en condiciones inadecuadas, las semillas se percibían un tanto más blandas al tacto, con la testa más flexible que en los frijoles frescos. Incluso fue más sencillo separar la testa de los cotiledones en todos los cultivares. Esta disminución en la dureza, sugiere que las semillas se

humedecieron, aunque esta ganancia en agua no fue suficiente para inducir la protrusión de la radícula, ya que no se detectó germinación de las semillas.

En la gráfica 1 se muestra el patrón de cocción de las semillas almacenadas por 75 días en condiciones inadecuadas. El patrón gráfico de la cocción de frijol es de tipo sigmoideo. Una observación cuidadosa de las curvas en esta gráfica indica que las variedades Flor de Mayo Mam 38 y Negro Otomí, no siguen este patrón. En estos cultivares se observan tres niveles de endurecimiento.



**Figura 9.** Tiempo de cocción para semillas almacenadas en condiciones inadecuadas.

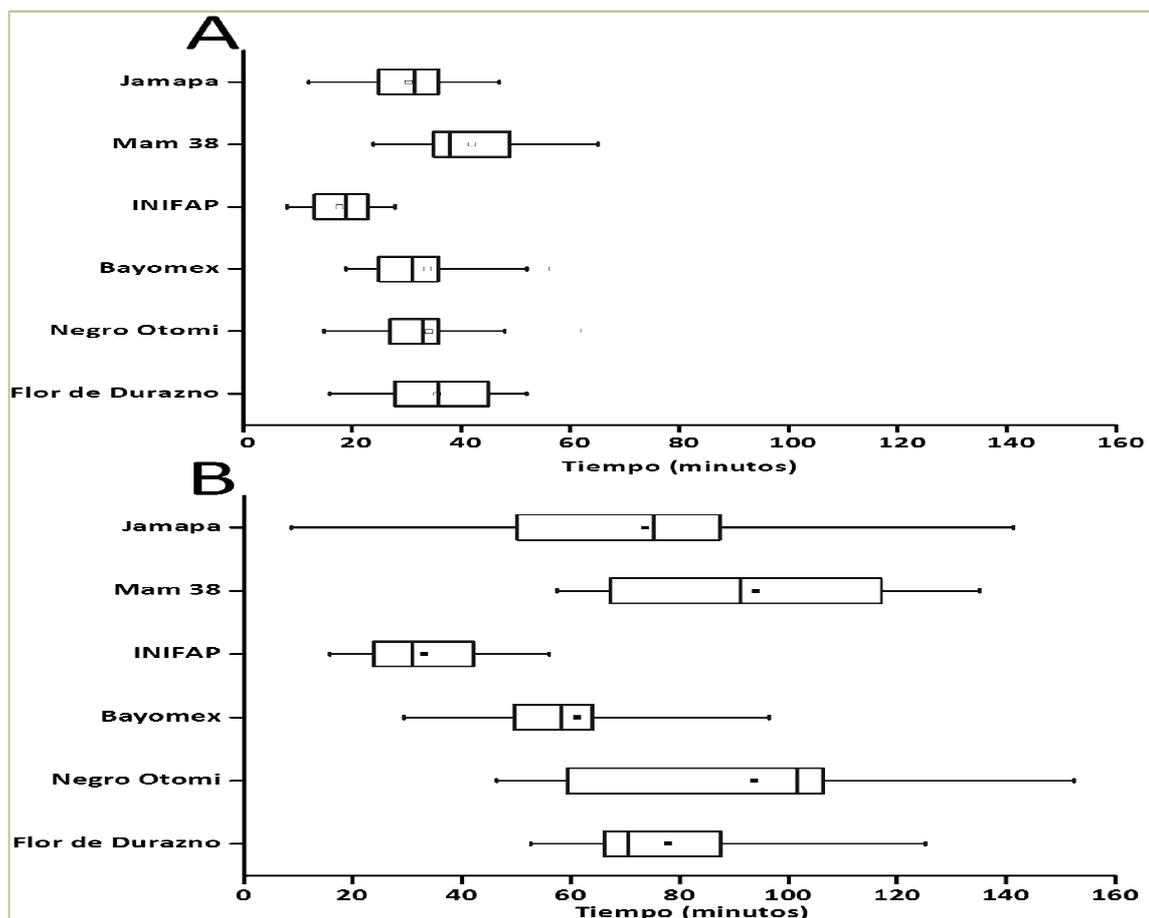
De estas gráficas se calculó por interpolación el tiempo que tardó el 50 % de las semillas en cocerse, los resultados se muestran en el cuadro 12, en el cual para efecto de comparación se incluyen el TC<sub>50</sub> de los mismos lotes de semillas antes del tratamiento de almacenamiento (Hernández, 2010).

<b>Cuadro 12.</b> Tiempo de cocción de semillas de frijol frescas y almacenadas.			
Cultivares	Semilla Fresca (min)*	Semilla endurecida (min)	SUSCEPTIBILIDAD al endurecimiento (TC <sub>50</sub> end/TC <sub>50</sub> fresco)
INIFAP	27	30.8	1.14
Negro Otomí	34	99.4	2.92
Flor de Durazno	37	69.5	1.87
Negro Jamapa	43	72.2	1.67
Bayomex	36	56.5	1.56
Mam 38	38	91.2	2.40

\* Hernández, 2010.

Si definimos la susceptibilidad a endurecerse de la semilla, como las veces que el tiempo de cocción (TC<sub>50</sub>) del frijol endurecido se incrementó, respecto del tiempo de cocción del frijol fresco (cuadro 11), los cultivares se pueden clasificar en tres grupos. Un primer grupo de cultivares no susceptibles al endurecimiento, a este grupo sólo pertenece el cultivar INIFAP. El segundo grupo de los cultivares medianamente susceptibles al endurecimiento, entre los cuales se encuentran Bayomex, Flor de Durazno y Negro Jamapa. En estos cultivares, el tiempo de cocción de las semillas endurecidas se incrementó menos de dos veces respecto al de sus controles. El tercer grupo formado por los cultivares Flor de Mayo Mam-38 y Negro Otomí, en los cuales el tiempo de cocción de los frijoles endurecidos fue mayor de dos veces, respecto de sus contrapartes frescos. Sin embargo, si la susceptibilidad de los frijoles se considera como el período que tarda en cocerse la población total de semillas (Fig. 10), los cultivares en cada grupo varía. En esta clasificación, los cultivares más susceptibles fueron los

cultivares de color negro. Los medianamente susceptibles los de color beige y finalmente el de menor colorido, el cultivar INIFAP, que permaneció como el cultivar con menor susceptibilidad al endurecimiento (Fig.10 A y 10 B).



**Figura 10.** Distribución de los Tiempos de cocción de la muestra de semillas frescas (A) y de las almacenadas inadecuadamente (B).

## 6.2 Abundancia de proteína en la pared celular

El endurecimiento del frijol se asocia a cambios en la pared celular, entre los que se encuentran: la disminución en la termosolubilización de las pectinas y en la pérdida de rigidez de la pared celular. Sin embargo, esta estructura celular contiene además de polisacáridos, proteínas cuya función puede ser estructural o enzimática y a la fecha no se había estudiado si el

endurecimiento modifica la solubilidad de dichas proteínas. Con la finalidad de conocer si la solubilidad de las proteínas de pared celular se modificaba por el endurecimiento, se determinó la cantidad de proteína extraída de pared celular de cotiledones aislados de semillas de frijol endurecido y fresco, los resultados se muestran en el cuadro 13. El endurecimiento de la semilla de frijol resultó en una disminución de la solubilidad de las proteínas de la pared celular.

**Cuadro 13.** Efecto del endurecimiento de la semilla de frijol en la cantidad de proteína extraída de pared celular.

Cultivar	Proteína (mg proteína/g de harina de cotiledón)		Proteína insolubilizada (mg/g)
	Semillas control	Semillas deterioradas	
INIFAP	18.93 ± 3.45 <sup>a</sup>	11.80 ± 3.54 <sup>a</sup>	7.13
Mam 38	11.80 ± 1.54 <sup>b</sup>	6.15 ± 0.68 <sup>b</sup>	5.65
Negro Jamapa	17.20 ± 1.55 <sup>c</sup>	7.26 ± 2.40 <sup>b</sup>	9.94
Flor de Durazno	18.07 ± 0.54 <sup>a</sup>	16.22 ± 5.08 <sup>a</sup>	1.85
Negro Otomí	12.86 ± 2.39 <sup>b</sup>	9.16 ± 1.29 <sup>b</sup>	3.70
Bayomex	10.85 ± 2.41 <sup>b</sup>	5.47 ± 1.48 <sup>b</sup>	5.38

Los números representan la media ± desviación estándar. Números en una columna con la misma letra como superíndice no presentan diferencias significativas.

La insolubilización de proteínas en pared celular se realiza a través de la acción de peroxidasas de pared celular (Brady y col 1996), por lo que, el siguiente paso fue establecer si entre las proteínas extraídas de la pared celular se encontraba una con actividad de peroxidasa.

### **6.3 Efecto del endurecimiento del frijol en la actividad de peroxidasa de pared celular.**

La actividad de peroxidasa de pared celular en los cultivares frescos fue mayor e igual entre los cultivares INIFAP y Negro Otomí, mientras que en los

cultivares Bayomex y Flor de Durazno fue alrededor de 50 % menor (cuadro 14). La actividad de peroxidasa detectada en el cultivar Negro Jamapa fue entre tres y siete veces mayor que la detectada en los otros cultivares (cuadro 14). El endurecimiento de la semilla disminuyó, de manera significativa, la actividad de esta peroxidasa, la magnitud de este decremento fue cultivar dependiente. No obstante, no se encontró relación entre la actividad de peroxidasa detectada en el frijol control o en el endurecido y la sensibilidad al endurecimiento de frijol, ni tampoco entre el porcentaje de pérdida de actividad y la magnitud de la insolubilización de proteínas de pared celular (cuadro 13).

<b>Cuadro 14.</b> Actividad de POX aislada de pared celular.		
Cultivar	Actividad Especifica POX-Pirogalol (U/g de cotiledón)	
	Semillas control	Semillas deterioradas
INIFAP	5476.25 ± 1517.90 <sup>bc, €</sup>	4048.97 ± 708.01 <sup>€</sup>
Mam 38	4046.76 ± 1276.27 <sup>a,β</sup>	1421.29 ± 597.32 <sup>a,ψ</sup>
Negro Jamapa	14585.56 ± 3963.96 <sup>c,ψ</sup>	646.72 ± 176.72 <sup>a,γ</sup>
Flor de Durazno	2292.97 ± 328.50 <sup>a,ε</sup>	1423.44 ± 244.62 <sup>a,ε</sup>
Negro Otomí	4942.84 ± 848.56 <sup>ab, θ</sup>	1091.08 ± 348.58 <sup>a, λ</sup>
Bayomex	2869.40 ± 490.54 <sup>a, Ω</sup>	822.58 ± 220.59 <sup>a, δ</sup>

Los números representan la media ± desviación estándar. Números en una columna con la misma letra como superíndice no son significativamente diferentes a una p < 0.05 ; números en el mismo renglón con el mismo signo como superíndice no son significativamente diferentes a una p < 0.05

Sin embargo, si la actividad de la enzima se expresa como actividad específica (Cuadro 15), se grafica el porcentaje que la actividad específica de peroxidasa disminuye por efecto del endurecimiento contra la sensibilidad de la semilla de frijol a endurecerse, los cultivares se pueden clasificar en dos grupos. El primero en el cual están los cultivares INIFAP, Bayomex y Flor de

Mayo Mam 38, con una correlación de 0.8, mientras que los cultivares Negro Jamapa, Flor de Durazno y Negro Otomí forman un segundo grupo con una correlación de 0.7.

<b>Cuadro 15.</b> Actividad específica de POX en pared celular.		
Cultivar	Actividad Especifica POX-Pirogalol (U/mg proteína)	
	Semillas control	Semillas deterioradas
INIFAP	624.63 ± 77.15 <sup>bc,€</sup>	248.14 ± 52.44 <sup>¥</sup>
Mam 38	335.95 ± 125.79 <sup>a,£</sup>	200.02 ± 85.81 <sup>£</sup>
Negro Jamapa	876.24 ± 256.37 <sup>b,€</sup>	103.20 ± 40.88 <sup>¥</sup>
Flor de Durazno	348.40 ± 124.61 <sup>a,€</sup>	77.78 ± 11.33 <sup>¥</sup>
Negro Otomí	393.81 ± 31.20 <sup>a,€</sup>	109.04 ± 41.44 <sup>¥</sup>
Bayomex	262.99 ± 54.11 <sup>a,€</sup>	139.40 ± 36.17 <sup>¥</sup>

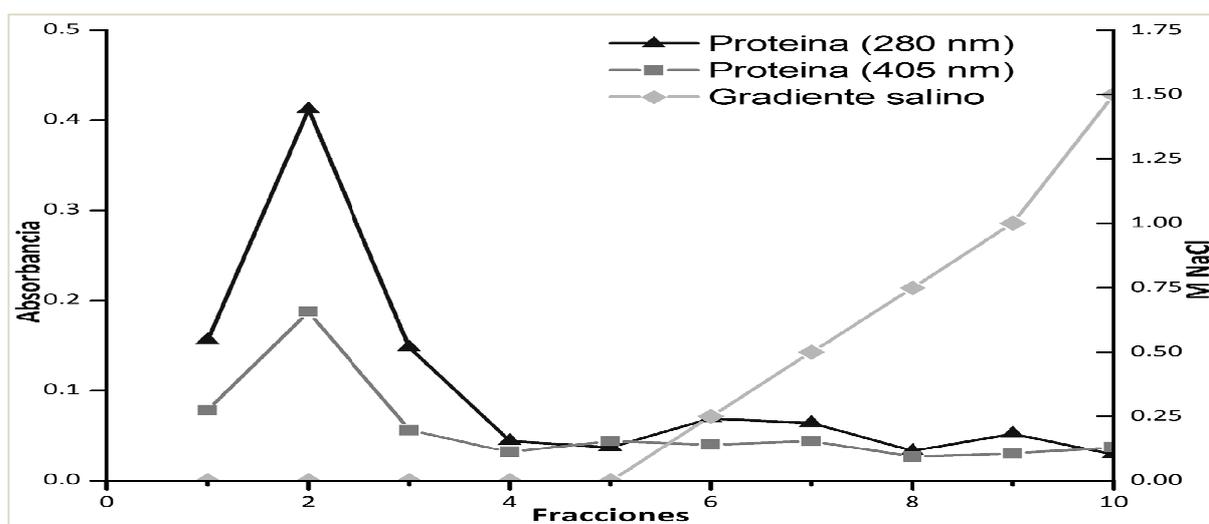
Los números representan la media ± desviación estándar. Números en una columna con la misma letra como superíndice no son significativamente diferentes a una p < 0.05 ; números en el mismo renglón con el mismo signo como superíndice no son significativamente diferentes a una p < 0.05

#### 6.4 Purificación de la peroxidasa de pared celular

Con la finalidad de contar con la peroxidasa purificada de pared celular que en un futuro próximo, permita generar herramientas moleculares para que faciliten su detección en problemas del frijol, se decidió purificar la peroxidasa de pared celular del cultivar Bayomex, por ser uno de los cultivares que presentaron una susceptibilidad intermedia al endurecimiento, y además ser el lote con mayor cantidad de semilla.

La actividad de la enzima se concentró por precipitación con sulfato de amonio, seguida de diálisis para retirar las sales de amonio que pudieran estar presentes en la enzima concentrada; posteriormente se filtró a través de una columna de intercambio iónico. En un primer experimento, se utilizó acetato de sodio pH 5.5 como amortiguador de homogeneización, de diálisis y

como amortiguador de elución de una columna de intercambio catiónico (Figura 11). En estas condiciones, la enzima no se unió a la columna y sólo el 6 % de la proteína aplicada a la columna se unió a la misma. Además, a medida que se avanzó en el proceso de purificación se perdió actividad enzimática (Cuadro 16).



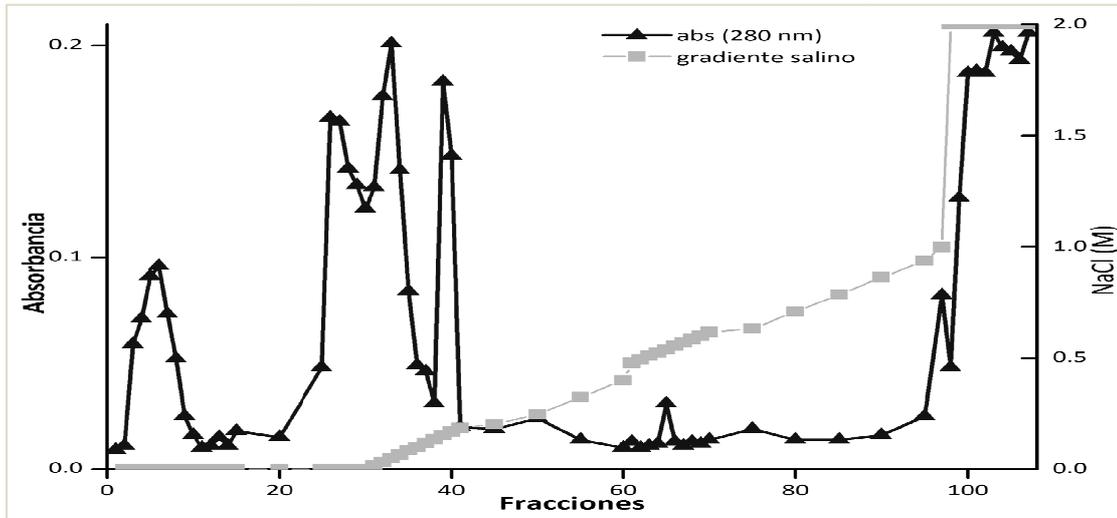
**Figura 11.** Perfil de elución del primer experimento de purificación de la columna de intercambio catiónico para extracto de enzimas de pared celular de frijol.

**Cuadro 16.** Purificación de POX al utilizar una columna catiónica.

Paso	Volumen (ml)	$\Delta$ D.O. min	Actividad (U/ml)*	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Actividad Total (U)	Proteína total (mg)	Purificación	Rendimiento (%)
<b>Extracto crudo</b>	11	0.0218	549.45	0.0261	21078.67	6043.96	0.287	1.0	100.00
<b>Extracto concentrado</b>	3	0.0096	243.09	0.0448	5426.12	729.27	0.134	0.3	12.07
<b>Filtrado Frac 1</b>	2.4	0.0035	87.41	0.0176	4966.62	209.79	0.042	0.2	3.47
<b>Filtrado Frac 2</b>	2.8	0.0033	83.25	0.0159	5242.45	233.10	0.044	0.2	3.86
<b>Filtrado Frac 3</b>	2.5	0.0029	72.43	0.0079	9203.00	181.07	0.020	0.4	3.00
<b>Filtrado Frac 6</b>	2.7	0.0044	16.48	0.0075	2191.96	44.51	0.020	0.1	0.74

\*Actividad determinada con 15  $\mu$ l de extracto y utilizando el coeficiente de extinción del producto de la reacción Purpurogalina ( $0.00264 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). 1U =  $\mu\text{mol}$  de purpurogalina formada en un min. Recuperación 90.6 %.

Del resultado anterior se concluyó que las proteínas extraídas de pared celular en su gran mayoría presentaban un pI < de 5.0, que a pH 5.5 se encontraban en forma aniónica y por eso no se pegaron a la columna de intercambio catiónico. Además, el hecho de que la actividad de la enzima se perdiera durante el proceso de purificación indicaba que a pH 5.5 la actividad de peroxidasa no era estable. Por lo que anterior se decidió extraer la enzima en un amortiguador de pH 7.5 y utilizar una columna de intercambio aniónico. En la figura 12 se observa que el 90 % de la proteína se unió a la columna, la mayor parte eluyó en menos de 0.5 M del gradiente de NaCl. En el cuadro 17 se observa que los volúmenes de las fracciones no fueron similares y que al menos a 280 nm se eluyó mucha proteína a alta concentración de sal. Para calcular el porcentaje de recuperación de la proteína en la columna, ésta se cuantificó por el método de Lowry. Se recuperaba casi el doble (4.9 mg) de la cantidad aplicada en la columna (2.18 mg). Esto puede deberse a alguna interferencia en el ensayo de Lowry debido a la alta concentración de sal en las últimas muestras de la columna además, de la actividad de peroxidasa aplicada a la columna sólo se recuperó el 59.29 % de la actividad. Por lo que se realizó un tercer experimento.



**Figura 12.** Perfil de elución del segundo experimento de purificación en columna de intercambio aniónico para un extracto de enzimas de pared celular de frijol.

**Cuadro 17.** Purificación de POX al utilizar una columna aniónica.

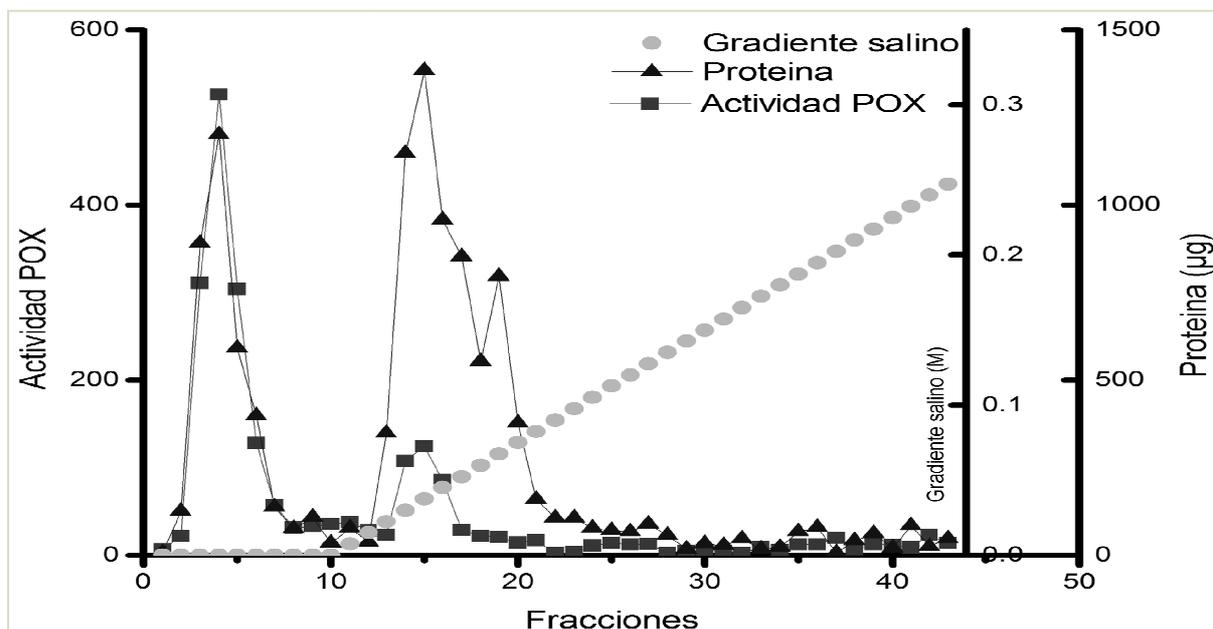
Paso	Volumen (ml)	$\Delta$ D.O. (min)	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Purificación	Rendimiento (%)
Extracto salino	20	0.0326	823.76	0.52	1586.22	16475.28	10.39	1.0	100.00
Diálisis	22	0.0142	358.32	0.11	3141.46	7883.04	2.51	2.0	47.85
Precipitación	3	0.0683	1725.15	0.78	2219.64	5175.44	2.33	1.4	31.41
Diálisis	3	0.0704	1776.71	0.73	2443.16	5330.14	2.18	1.5	32.35
<b>Fracciones de la columna</b>									
06	1.2	0.0066	165.87	0.14	1181.60	201.53	0.17	0.7	1.22
10 -11	2.4	0.0010	7.82	0.12	64.13	18.77	0.29	0.0	0.11
19	1.2	0.0005	13.02	0.21	61.60	15.63	0.25	0.0	0.09
26	1.3	0.0127	320.84	0.17	1837.70	405.86	0.22	1.2	2.46
33	1.2	0.0055	138.76	0.19	739.06	166.51	0.23	0.5	1.01
35	1.5	0.0007	17.28	0.19	93.34	25.92	0.28	0.1	0.16
39	0.6	0.0027	69.11	0.12	554.73	41.47	0.07	0.3	0.25
46	1.5	0.0025	63.73	0.08	772.59	95.59	0.12	0.5	0.58
49 - 51	4.0	0.0027	20.66	0.09	228.54	82.62	0.36	0.1	0.50
53 - 60	8.2	0.0048	36.16	0.09	424.88	296.54	0.70	0.3	1.80
65	1.3	0.0046	116.09	0.06	1974.33	155.56	0.08	1.2	0.94
61 - 69	9.8	0.0017	12.50	0.09	142.46	122.50	0.86	0.1	0.74

**Cuadro 17.** Purificación de POX al utilizar una columna aniónica.

Paso	Volumen (ml)	$\Delta$ D.O. (min)	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Purificación	Rendimiento (%)
<b>Fracciones de la columna</b>									
<b>71 - 89</b>	18.0	0.0038	29.01	0.06	516.51	522.19	1.01	0.3	3.17
<b>90 - 95</b>	4.5	0.0056	42.25	0.09	496.35	190.11	0.38	0.3	1.15

### 6.5 Tercer experimento de purificación de peroxidasa

Dado que la optimización de la metodología para purificar una proteína es un proceso de prueba y error, de los experimentos anteriores, se decidió utilizar 5 ml de resina nueva (DEAE Sepharose), lavada con 32 ml de amortiguador de tris 20 mM, pH 7.5. Se preparó un extracto enzimático con mayor contenido de proteína que en los casos anteriores. Con la finalidad de evitar la pérdida de actividad de la peroxidasa, al amortiguador de extracción se le adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (ver apéndice pág. 76) y se aplicaron en la columna 3.0 ml de extracto enzimático conteniendo 3.5 mg de proteína. La otra modificación realizada fue disminuir la concentración del gradiente salino (30 ml de 0 M NaCl y 30 ml de 0.5 M de NaCl). En esta ocasión la proteína de cada fracción se cuantificó por el método Bradford y la actividad también fue ensayada de manera estándar.



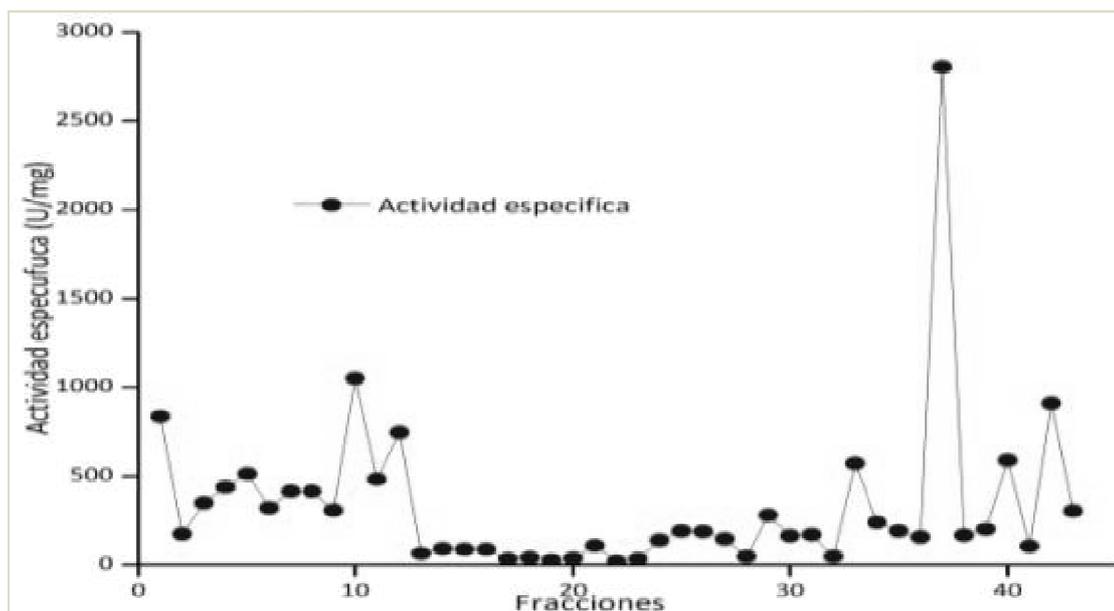
**Figura 13.** Perfil de elución para enzimas de pared celular del tercer experimento de purificación con una columna de intercambio aniónico.

**Cuadro 18.** Cuadro de purificación para una columna aniónica

Paso	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Actividad Total (U)	Proteína total (mg)	Purificación	Rendimiento (%)
Extracto salino dializado	44	1725.146	0.9190	1877.27	75906.43	40.435	1.0	100.00
Precipitado y dializado	8.5	1776.714	1.1788	1507.26	15102.07	10.020	0.8	24.78
Proteína aplicada a la columna	3.0	5330.143	1.1788	1507.26	4521.79	3.51		
Fracciones mezcladas								
Fracción I (4 y 5)	2.15	469.697	0.443	1061.06	1009.85	0.952	0.6	2.35
Fracción II (10,11,12,33,37,40 y 41)	9.7	348.485	0.019	18477.45	3380.30	0.183	12.25	0.45

En la figura 13 se observan dos picos de actividad de peroxidasa. El primero, de mayor actividad, que eluye con la proteína que no se unió a la columna (fracciones 2-8), y el segundo, con menor actividad que el primero y que eluye con el mayor pico de proteína (fracciones 12-16). Las fracciones

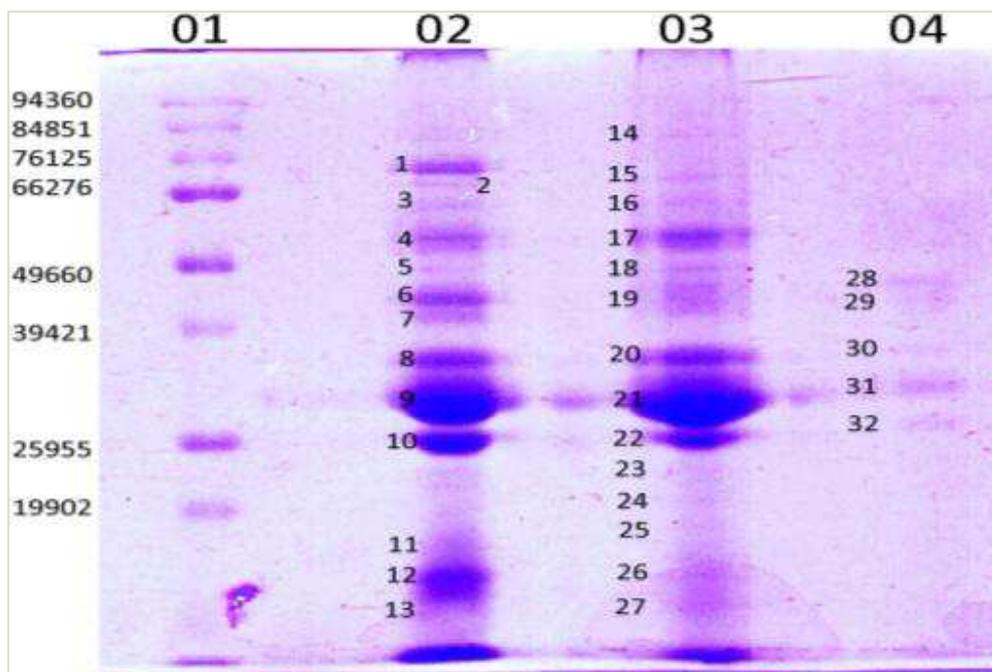
reunidas fueron las 4 y 5 (pico I) que presentaron gran actividad y las 10, 11, 12, 33, 37, 40 y 42 (pico II). Estas últimas debido a que la actividad específica en cada una de estas fracciones fue mayor de 500 (figura 14).



**Figura 14.** Perfil de actividad específica para fracciones eluidas en columna de intercambio aniónico.

Dado que el proceso de purificación no pudo ser monitoreado por el incremento en actividad específica, debido a que en las fracciones 37, 40 y 41 donde prácticamente no hay actividad y muy poca proteína, se produce una gran actividad específica, lo que se hizo fue corroborar el proceso de purificación a través de geles de SDS-PAGE. En la figura 15 se observan los péptidos presentes en las distintas etapas de la purificación de peroxidasa. En el carril 1 se muestran los marcadores de peso molecular, en el 2 se aplicó una alícuota del extracto crudo precipitado con sulfato de amonio y dializado, que corresponde a la muestra aplicada en la columna, se observan 13 péptidos. En el carril tres se aplicó una alícuota del pico I. En éste se

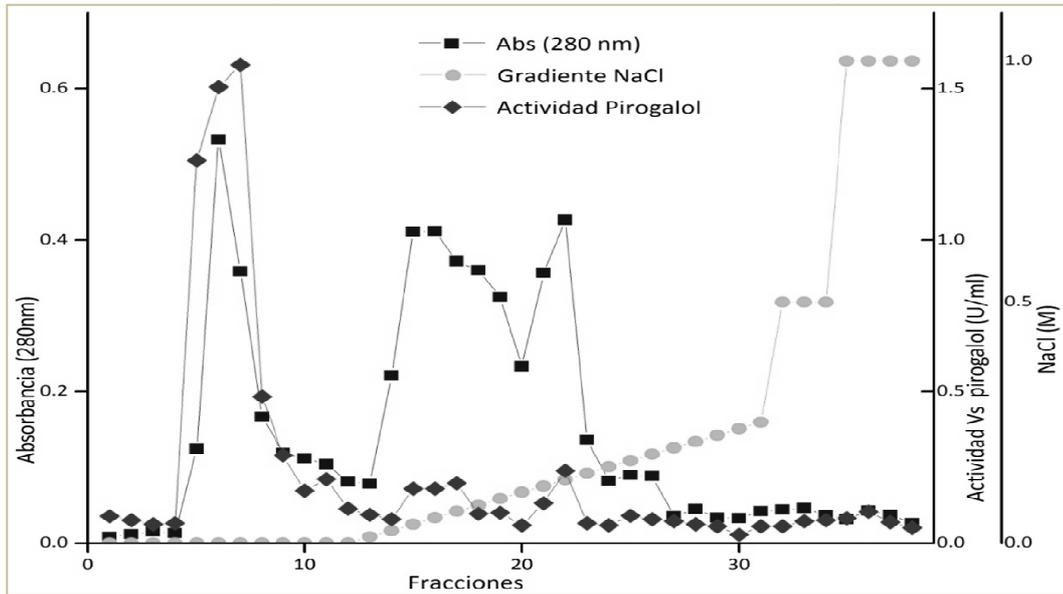
observan cuatro péptidos principales (17,20, 21, 22) y en el cuarto carril dónde se aplicó el pico II que eluyó de la columna, se observan algunas bandas muy tenues. Las bandas que se observan entre el carril 2 y 3, el 3 y 4, se deben a que se cargó mucha proteína y las bandas de aproximadamente 25 a 30 kDa, difundieron lateralmente. Los pesos moleculares de las bandas de proteína en los diversos carriles se muestran en el cuadro 19.



**Figura 15.** Geles de PAGE-SDS 12% de la purificación de enzimas de pared celular. En el carril uno se observan los marcadores de peso moleculares, en el carril dos se observa el patrón electroforético de la muestra de extracto crudo, en el carril tres, se observa una muestra de extracto previo a la filtración en columna. En el cuarto carril, el pico I.

<b>Cuadro 19.</b> Pesos moleculares de las bandas del gel SDS-PAGE 12 %					
<b>Carril 2</b>		<b>Carril 3</b>		<b>Carril 4</b>	
<b>Banda No.</b>	<b>PM (Da)</b>	<b>Banda No.</b>	<b>PM (Da)</b>	<b>Banda No.</b>	<b>PM (Da)</b>
<b>1</b>	72522	<b>14</b>	80836		
<b>2</b>	67669	<b>15</b>	69892		
<b>3</b>	62994	<b>16</b>	62994		
<b>4</b>	54592	<b>17</b>	55098		
<b>5</b>	49432				
		<b>18</b>	48977		
<b>6</b>	44760	<b>19</b>	44144	<b>28</b>	46659
<b>7</b>	41189			<b>29</b>	43940
				<b>30</b>	36529
<b>8</b>	34800	<b>20</b>	35531		
<b>9</b>	29881	<b>21</b>	29538	<b>31</b>	31657
				<b>32</b>	27434
		<b>22</b>	25836		
<b>10</b>	23556	<b>23</b>	23179		
		<b>24</b>	20556		
		<b>25</b>	18656		
<b>11</b>	17287				
<b>12</b>	15438	<b>26</b>	15367		
<b>13</b>	14339	<b>27</b>	13723		

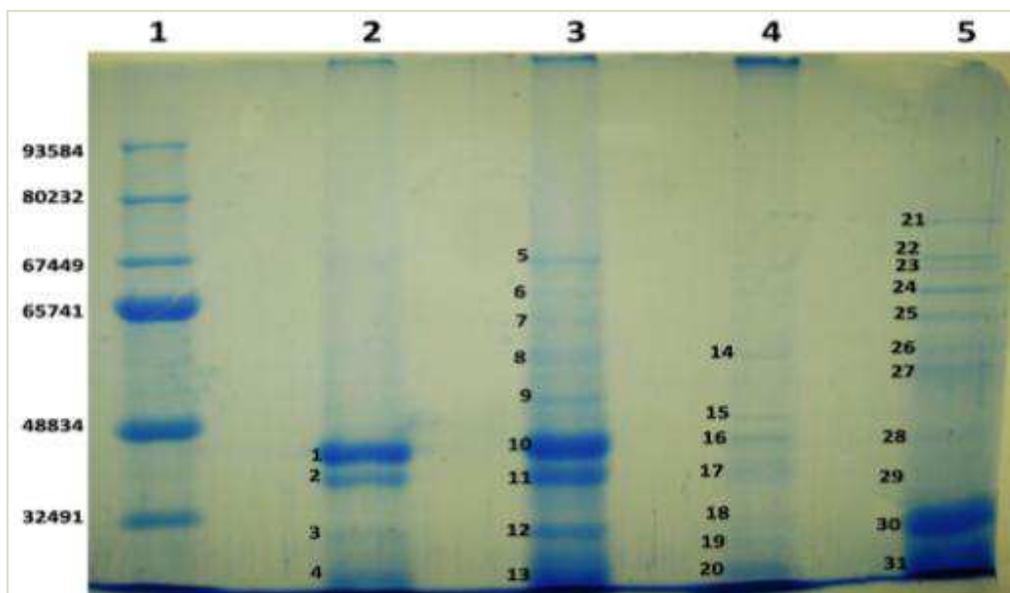
El experimento de purificación de la peroxidasa se repitió de manera similar al realizado en la columna de la figura 13. Como era de esperarse, del extracto de enzimas de pared celular, hubo una porción de proteína que no se unió a la columna según indica la detección de proteína a 280 nm (Figura 16).



**Figura 16.** Perfil de proteína detectado a 280 nm del cuarto experimento de purificación, producto de la elución en una columna de intercambio aniónico (DEAE).

**Cuadro 20.** Purificación de POX al utilizar una columna aniónica.

Paso	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Actividad Total (U)	Proteína total (mg)	Purificación	Rendimiento (%)
Extracto salino	55	575.76	1.15	500.66	31666.80	63.25	1.0	100.00
Precipitación ( $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ y Diálisis	7.5	2767.42	2.54	1080.60	20755.65	19.09	2.2	65.54
Muestra aplicada a la columna	4.45	2767.42	2.54	1080.6	12315.01	11.30	2.2	-
<b>Fracción</b>								
6	2.0	2148.23	0.084	25,574.16	4296.46	0.169	51.07	
15	2.0	166.92	0.301	554.58	333.84	0.603	1.10	
22	2.0	51.26	0.324	159.13	102.53	0.648	0.31	
28	2.0	3.54	ND	ND	7.07	ND	0	
36	1.4	40.40	0.30	134.66	56.56	0.423	4.6	
<b>Fracciones mezcladas y dializadas</b>								
POX1 (5,6 y 7)	2.3	2489.14	0.446	5581.03	5725.03	1.02	11.14	29
POX2 (15,16,17)	3	115.15	0.760	151.51	345.45	2.28	2.1	5.5

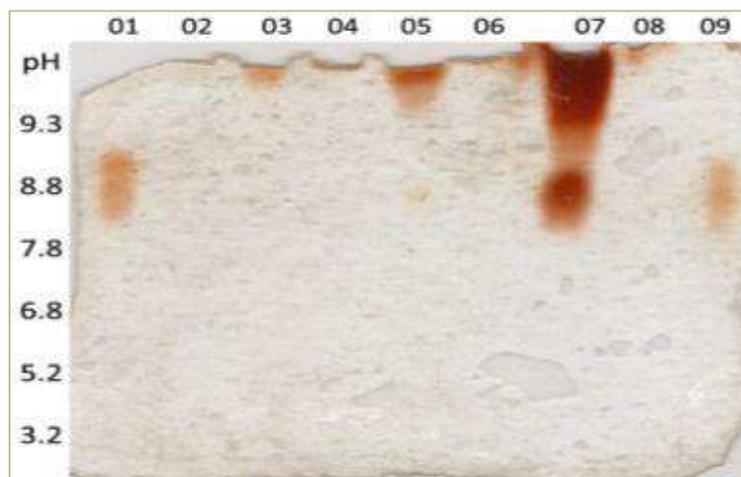


**Figura 17.** Gel de poliacrilamida 10% desnaturalizante para la purificación de algunas de las fracciones de la columna 4. En el carril 1 se observan los marcadores de PM (Biorad), en el carril 2 se aplicó una alícuota del extracto crudo, en el carril 3 se empleó una alícuota de la muestra precipitada con sulfato de amonio. En el carril 4 se corrió una alícuota de las fracciones filtradas en columna y que en el cuadro 17 se denomina fracción POX1, en el carril 5 se aplicó la fracción POX2 del mismo cuadro.

<b>Cuadro 21.</b> Pesos moleculares de las bandas del gel SDS-PAGE 10 %.							
<b>Carril 2</b>		<b>Carril 3</b>		<b>Carril 4</b>		<b>Carril 5</b>	
<b>Banda No.</b>	<b>PM (Da)</b>	<b>Banda No.</b>	<b>PM (Da)</b>	<b>Banda No.</b>	<b>PM (Da)</b>	<b>Banda No.</b>	<b>PM (Da)</b>
						<b>21</b>	74739
						<b>22</b>	68745
		<b>5</b>	65858			<b>23</b>	65940
		<b>6</b>	62077			<b>24</b>	62547
		<b>7</b>	56789			<b>25</b>	58089
		<b>8</b>	52503	<b>14</b>	52108	<b>26</b>	52661
		<b>9</b>	46043			<b>27</b>	49502
				<b>15</b>	44071		
<b>1</b>	39593	<b>10</b>	40317	<b>16</b>	41420	<b>28</b>	40930
<b>2</b>	36827	<b>11</b>	36882	<b>17</b>	37274	<b>29</b>	37955
<b>3</b>	31525	<b>12</b>	31764	<b>18</b>	32198	<b>30</b>	32935
<b>4</b>	27982	<b>13</b>	27982	<b>19</b>	30266		
				<b>20</b>	28194	<b>31</b>	28839

## **6.6 Caracterización de la peroxidasa purificada.**

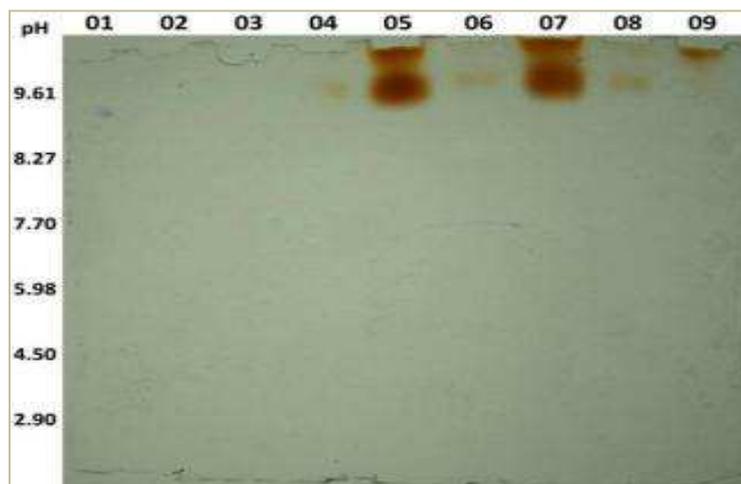
Los parámetros determinados para la peroxidasa purificada fueron el pI y el  $K_m$  para ácido ferúlico. El primero se determinó mediante electroenfoque. El gradiente de pH fue de 9.3 a 3.25. En la figura 18 se observan tres carriles con diferente intensidad de coloración. Esto se debe a diferencias en la actividad de las diversas fracciones, con el mismo volumen, utilizando o-dianisidina como sustrato. En el carril 3 se adicionaron 5.22 unidades del pico II de la columna mostrada en la figura 16. En el carril 5 se adicionaron 7.03 unidades del pico I (figura 16) y por último en el carril 7 se adicionaron 26 unidades del extracto precipitado con sulfato de amonio y dializado. En este caso se observó un barrido de actividad de peroxidasa desde pH 9.3 hasta 7.8. Sugiriendo la presencia de varias isoenzimas de peroxidasa con diferente pI en el extracto original, las cuales durante la purificación se van eliminando. Quedando sólo una, la de pI más básico presente tanto en la fracción I como en la II (figura 18).



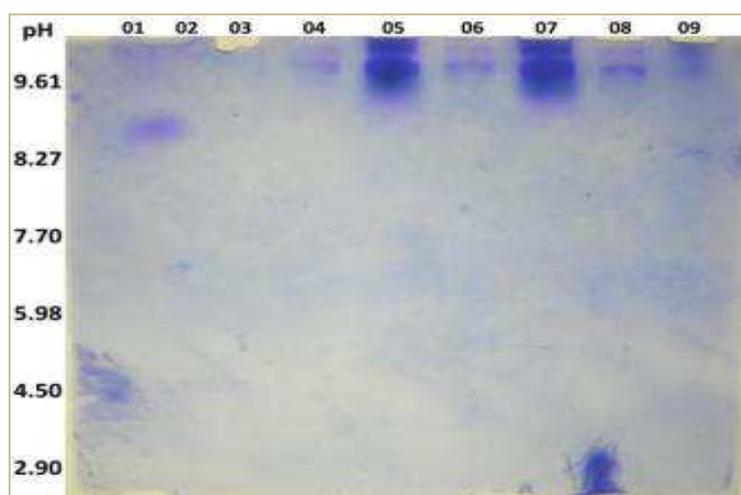
**Figura 18.** Electroforesis en gradiente de pH de la actividad de peroxidasa utilizando o-dianisidina como sustrato para revelar la actividad enzimática.

Para corroborar el pI de las peroxidasas de pared celular de cotiledón y que la determinación fuera más precisa, se realizó de nuevo un electroenfoque de las peroxidasas purificadas en la columna de la gráfica 6, en un gel de acrilamida al 10 % con anfólicas en el rango de pH de 11 a 3. En este caso se obtienen bandas bien definidas (figura 19) con un pI mayor de 9.61, ya que la actividad de peroxidasa se encontró a pH más alcalino que el promedio del pH determinado por potenciometría. Sorprendentemente, la fracción 6, aplicada en el carril 9, donde la peroxidasa se purifica cerca de 50 veces respecto del extracto inicial, la actividad apenas se detectó. Lo anterior puede deberse a que en los carriles 5 y 7, la cantidad de proteína aplicada fue de entre 34 y 33  $\mu\text{g}$  respectivamente, mientras que en el carril 9 sólo se adicionaron 3  $\mu\text{g}$ , quizás la poca concentración de proteína, presente en la muestra aplicada, no pudo mantener su estructura, y perdió su actividad de peroxidasa. Efectivamente cuando el gel de la figura 19 se tiñó con azul de

coomasie (Fig. 20), se detecta una banda de proteína común a todos los carriles y que presenta un pI mayor de 9.61 (carriles 5-9). En los carriles 00 y 01 se observan los marcadores de pI rojo de metilo (pH 3.5) y tripsinogeno (pH 9.5) respectivamente.



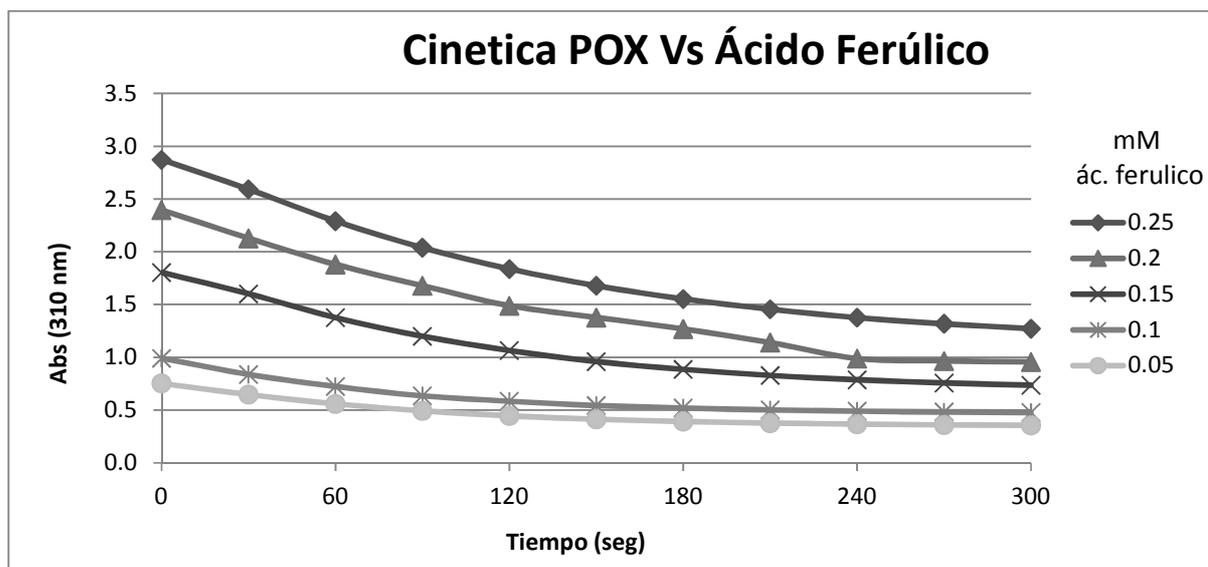
**Figura 19.** Zimograma de actividad de peroxidasa revelado con Orto - Dianisidina. En la parte izquierda, se muestran los pH del gradiente cuantificado por potenciometría. Carril 5, extracto crudo. Carril 7, extracto aplicado a la columna. Carril 9, fracción 6 de la grafica 7.



**Figura 20.** Tinción con azul de Coomasie del zimograma de la figura 19, con la finalidad de detectar los marcadores de pI.

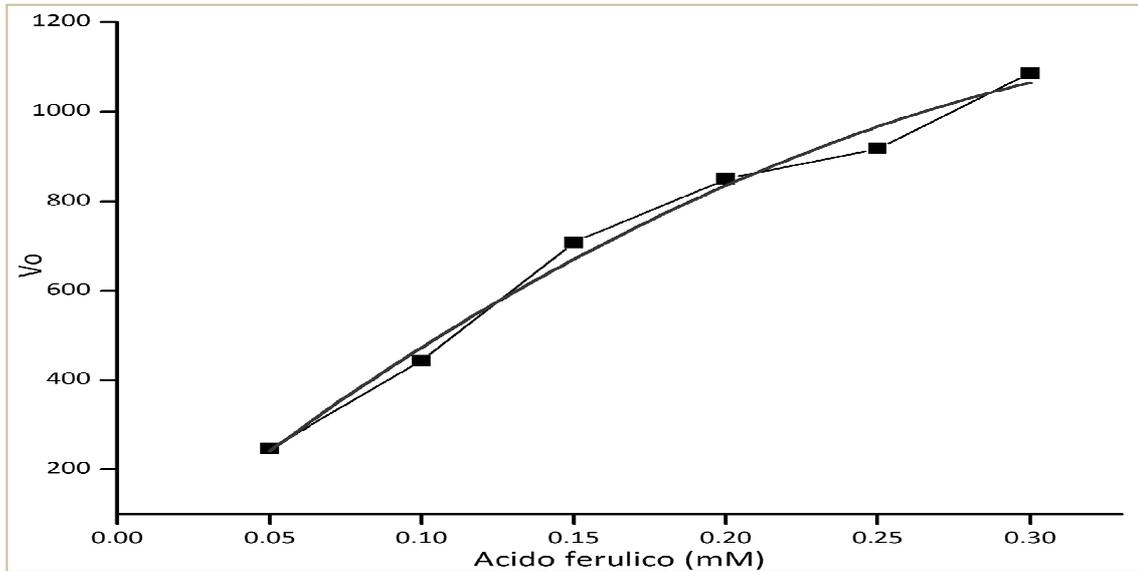
Como parte de la caracterización de una enzima, además del peso molecular y el punto isoeléctrico, se encuentran los parámetros cinéticos de  $k_m$  y de  $V_{max}$ . Estos parámetros indican la afinidad de la enzima por su sustrato y la cantidad máxima de sustrato que la enzima puede convertir en producto por unidad de tiempo. Para obtener dichos parámetros hay distintos métodos, el más común consiste en determinar la velocidad de la enzima a diferentes concentraciones del sustrato. El sustrato utilizado para determinar los parámetros cinéticos de la peroxidasa de pared celular de frijol fue el ácido ferúlico, debido a que este derivado del ácido cinámico se encuentra unido mediante enlace éster a las pectinas de la pared celular de las células del cotiledón (García y Cols. 1998). Y como se indica en la hipótesis planteada, la peroxidasa podría ser una de las enzimas que participe en el entrecruzamiento covalente de las pectinas por la formación de dímeros de ácido ferúlico; y así incrementar el tiempo de cocción del frijol, cuando esta semilla se almacena en condiciones inadecuadas, de alta temperatura y humedad relativa también alta.

Para la determinación del  $K_m$  aparente de la peroxidasa por el ácido ferúlico, se utilizó la fracción 6 de la cromatografía mostrada en la figura 16, como fuente de la enzima y se ensayó su actividad a diferentes concentraciones de ácido ferúlico (Fig. 21).

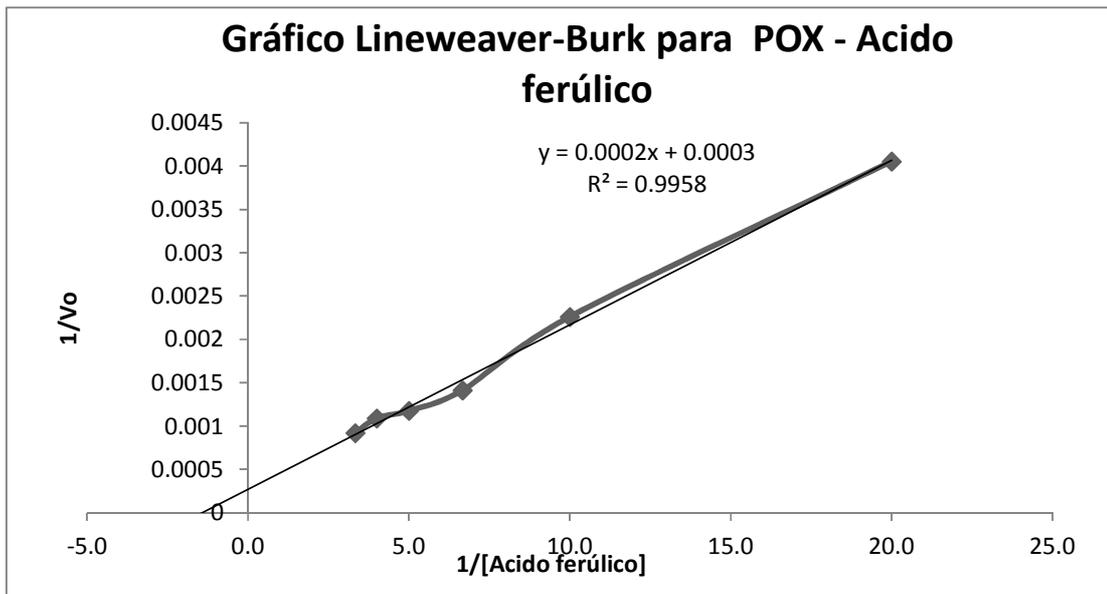


**Figura 21.** Ensayos enzimáticos de Peroxidasa de pared celular usando Acido ferúlico como sustrato. Para estos, se emplearon en cada ensayo 40  $\mu$ l del extracto purificado en la fracción 6 de la columna de intercambio aniónico mostrado en la gráfica 7.

Para cada concentración de ácido ferúlico se calculó la velocidad inicial y se graficó en función de concentración del ácido ferúlico (Fig. 22). La cinética que presenta la peroxidasa se ajusta al modelo de Michaelis - Menten. Desafortunadamente, la concentración de saturación de la enzima por el sustrato no pudo ser observada, porque a concentraciones mayores de 0.3 mM, el ácido ferúlico se precipitaba en el ensayo y las absorbancias eran mayor de 4.0 D.O a 310 nm y el espectrofotómetro utilizado sólo cuantifica hasta 4.0.



**Figura 22.** Velocidad enzimática obtenida de los ensayos a distinta concentración de ácido ferúlico.



**Figura 23.** Gráfica de Lineweaver-Burk para calcular la  $K_m$  y la  $V_{max}$  de peroxidasas de pared celular sobre ácido ferúlico.

Posteriormente se trazó las gráfica de los inversos de velocidad y concentración de sustrato. Esta gráfica se ajustó a una regresión lineal para calcular con precisión los parámetros cinéticos (Fig. 23). De acuerdo a la

ecuación de Lineweaver-Burk la pendiente representa  $K_m/V_{max}$  y la ordenada al origen  $1/V_{max}$ . Por tanto, la  $V_{max}$  de la peroxidasa de pared celular fué de 3333.33  $\mu\text{M}$  de ácido ferúlico/min y el  $K_m$  aparente, porque no se logró la saturación de la enzima, fué de 1.34 mM de ácido ferúlico.

### 6.7 Actividad de la enzima con distintos sustratos

Se evaluó la actividad que la enzima presenta al realizar el ensayo enzimático utilizando ácido ferúlico como sustrato, ya que éste compuesto está presente en la pared celular, y se comparó con la actividad que la enzima presenta con O-dianisidina utilizada para poder revelar la actividad en los geles de Isoelectroenfoque (zimogramas). Por último, se reporta la actividad de la peroxidasa sobre el Pirogalol debido a que ya se tenía información acerca de la actividad de la POX de pared celular sobre este compuesto.

Los tres compuestos fueron evaluados y la actividad se reporta en el cuadro 22. Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en las condiciones como se muestra en el apéndice en los cuadros A1, A2 y A3 con extracto semi-purificado de peroxidasa de pared celular. La actividad fue mayor con pirogalol como sustrato y menor con ácido ferúlico.

<b>Cuadro 22.</b> Actividad de peroxidasa de pared celular sobre distintos compuestos.			
Sustrato	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Actividad por gramo de harina. (U/g harina)
O-Dianisidina	25 732.00	38 636.63	419 207.50
Acido ferúlico	22 293.75	33 778.40	366 495.64
Pirogalol	30 530.00	45 840.84	497 373.11

## **7. Discusión**

La actividad del agua ( $a_w$ ) en las semillas durante su almacenamiento, depende de la humedad relativa en el ambiente del almacén (Vertucci, 1993). En este trabajo se utilizó una humedad relativa de 75 % y se ha reportado que en estas condiciones, las semillas de frijol incrementan su contenido de humedad hasta alcanzar una  $a_w$  de 0.75 (Paredes-López y cols. 1989). Por lo anterior, el incremento en el contenido de agua de las semillas de frijol almacenadas a 30 °C y 75 % de NaCl propició que aquellas enzimas que son activas a una  $a_w$  de 0.75 se activaran y su velocidad se incrementara ya que la temperatura fue de 30 °C. Sin embargo, la actividad "in situ" se detecta sólo para las enzimas cuyo sustrato se encuentra cercano, ya que la difusión molecular a esta  $a_w$  es restringida (McKay, 1989). Este es el caso de la peroxidasa de pared celular del frijol. Las peroxidasas son activas desde una  $a_w$  de 0.369 (McKay, 1989). Por lo que, la peroxidasa de la pared celular de frijol durante el almacenamiento, podría presentar actividad y por tanto, utilizar como sustrato al ácido ferúlico, cuya presencia se ha demostrado en la pared celular de frijol (Tintor, 2011; García y cols. 1998), su localización en frijol carioca se ha reportado unido a las pectinas (García y cols. 1998). Evidencia adicional que apoya la anterior sugerencia, es el resultado de este trabajo. El cual demuestra que la POX 1 de pared celular de frijol también es capaz de utilizar *In vitro* al ácido ferúlico como sustrato.

El hecho de que en la pared celular del frijol se encuentre una peroxidasa capaz de oxidar *In vitro* al ácido ferúlico, también presente en este compartimento, permite inferir que durante el endurecimiento de las semillas del frijol se formaron enlaces covalentes entre ferúlicos vecinos, lo que a su vez permitieron que las pectinas quedasen unidas, ya sea entre ellas mismas, o con cadenas de hemicelulosas a través de estos enlaces éster, que resulta en polisacáridos de mayor peso molecular, a los detectados en las pectinas aisladas del frijol control. De lo anterior, se concluye que el arreglo de los componentes de la pared celular en frijoles almacenados en condiciones inadecuadas es diferente del que presentan en el frijol control. Se ha demostrado que los frijoles que presentan pectinas de mayor peso molecular también presentan mayor tiempo de cocción, debido a que tanto la termosolubilización de las pectinas, como la termo-relajación de la pared celular, eventos fundamentales en la cocción del frijol, son más difíciles de realizar (Martínez, 2011). El otro tipo de enlace que también puede ser catalizado por una peroxidasa es la formación de enlaces di-isoditrosina. Las proteínas estructurales de la pared celular, pueden ser de tres tipos ricas en: glicina, prolina o en hidroxiprolina, y todas ellas además tienen un abundante contenido de tirosina. Estas proteínas se insolubilizan en la pared celular a través de enlaces iso-ditrosina (Showalter, 1993). Aparentemente estos enlaces a su vez, pueden ser oxidados para formar enlaces di-isoditrosina (Bradly y cols.1996) y al ser formados quedan

atrapados polisacáridos de la pared celular, modificando así su termosolubilidad. De lo discutido anteriormente se concluye que la peroxidasa de pared celular, participa en el mecanismo del endurecimiento del frijol por almacenamiento inadecuado.

La actividad de peroxidasa está constituida por varias proteínas cuyos pesos moleculares fueron desde 27814 hasta 45365 Da, ya que estas cinco bandas fueron detectadas en los geles (figuras 15 y 17) donde se separaron las proteínas presentes en el pico 1, y en la POX1 de las columnas mostradas en las figuras 13 y 16. En la pared celular de callos de frijol, se reportan dos isoenzimas una con peso molecular de 42000 y otra de 46000. Para la última isoenzima el pI reportado fue de 8.3 y además catalizó *In vitro* la formación de diferúlicos. El  $K_m$  aparente de estas enzimas por ácido ferúlico fue de 960  $\mu\text{M}$  y 113  $\mu\text{M}$  a pH 4.4, para la de bajo y alto peso molecular, respectivamente (Zimmerlin y cols.1994). El hecho de que el  $K_m$  aparente para ferúlico de la POX 1 (1.3 mM) sea mayor que el reportado por Zimerlin y cols. (1994), podría deberse a que la POX 1, aparentemente son dos enzimas, o bien la POX 1 es diferente de las isoenzimas reportadas previamente, así como el pH utilizado para determinarlo también fue diferente. Para demostrar si son dos isoenzimas o la misma enzima con diferente peso molecular se tendría que utilizar electroforesis 2-D y microsecuenciar para cada enzima. Aparentemente las dos bandas de proteína son la misma

isoenzima, ya que en el gel de la figura 19, carril 9, solo se encuentra una banda de actividad o de proteína con un solo pI mayor de 9.61.

La disminución en la actividad de peroxidasa por efecto del endurecimiento de la semilla se puede deber al menos a dos posibilidades. La primera: en diversas semillas se ha demostrado que cuando se almacenan a HR de 75 % y T de 30 °C, diversas enzimas pierden su actividad (Bernal-Lugo y cols. 1994).

La segunda: es que la solubilidad de la peroxidasa en soluciones salinas haya disminuido. Esto último ha sido reportado para la POX de pared celular aislada de callos de *S. baicalensis Georgi*, aunque no se demostró si el ácido ferúlico era uno de sus sustratos (Satoshi y cols. 1999).

El hecho de que la correlación encontrada entre la fracción que disminuye la actividad de la POX por efecto del endurecimiento, y la sensibilidad al mismo, se clasifiquen en dos grupos, puede deber a que la actividad fue cuantificada con pirogalol como sustrato y no con ferúlico, que aparentemente sería el sustrato natural. Además bien podría ser que las peroxidasas de uno de los grupos sean diferentes a las del otro; en este trabajo sólo se identificó la peroxidasa de uno de los grupos Bayomex. Otra posibilidad es que POX no sea el único factor genético que contribuye al endurecimiento de la semilla. Lo cual estaría de acuerdo con el hecho de que de acuerdo a la sensibilidad al endurecimiento de los cultivares estudiados se pueden clasificar en dos grupos separados, uno que presentó mayor

velocidad de endurecimiento y comprende frijoles claros, INIFAP, Bayomex y Flor de Mayo Mam 38; y el otro que contiene a los frijoles de color negro con una velocidad de endurecimiento 30 % menor que el grupo anterior. A la fecha no se tiene explicación para este comportamiento.

Los resultados anteriores indican que la actividad peroxidasa de pared celular de cotiledón de frijol sí participa en el endurecimiento del frijol.

## **8. Conclusiones**

De los resultados de este trabajo, se concluye que:

- La peroxidasa de PC de cotiledón de semillas de frijol utiliza como sustratos: ácido Ferúlico, Pirogalol y O-Dianisidina.
- El endurecimiento de frijol disminuye la actividad de peroxidasa de PC.
- La peroxidasa de PC de semillas de frijol resultó ser de tipo catiónico.
- El peso molecular de POX de PC fue similar que el reportado para otras peroxidases catiónicas.
- La afinidad de POX por ácido ferúlico fue mayor que la de otras reportadas.

## **9. Perspectivas.**

1. Definir el efecto del endurecimiento de la semilla de frijol en la actividad de peroxidasa utilizando el ácido ferúlico como sustrato.
2. Determinar el patrón de isoenzimas de peroxidasa de pared celular en los diferentes cultivares de frijol antes y después del endurecimiento de la semilla.
3. Cuantificar el contenido de ácido ferúlico y sus aductos oxidados en la pared celular de cotiledón de semillas control y endurecidas.
4. Purificar y caracterizar las isoenzimas de peroxidasa presentes en la pared celular de los cultivares INIFAP y Negro Jamapa.
5. Demostrar que las paredes celulares aisladas de cotiledón de frijol control son utilizadas por la peroxidasa de pared celular purificada.

## **10. Referencias**

- Ahmed M , Shehata ET. 1992. Hard to cook phenomenon in legumes. Food Reviews International. 8: 191-221.
- Bernal-Lugo I, Parra C, Carballo A, Hamabata A. 1994. Enzymatic systems altered by accelerated aging of seeds. Plant Physiol (Life Sci. Adv.) 13: 287-294.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brady JD, Sadler HI, Fry SC. 1996. Di-isodityrosine, a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross link. *Biochem J.* 315: 323-327.
- Chang Y. 1990. Enzymatic Browning in Relation to Phenolic Compounds and Polyphenoloxidase activity among various peach cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 38: 99 – 101.
- Dange V, Reddy G. 1984. Isolation and characterization of isoperoxidase from DEE-GEO-WOO-GEN rice seedlings. *Phytochem* 23:237-239.
- Garcia E. Filisetti T. 1998. Hard to cook Beans (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of phenolic compounds and pectates. *J. Agric Food Chem.* 46: 2110-2116.
- Granito, M., Guinand J. 2006. Composición química y nutricional de variedades *Phaseolus vulgaris* cultivadas en Venezuela. *Agronomía tropical* 56: 513-522
- Hernández Pérez A. 2010. Influencia de los niveles de actividad de la  $\beta$ -o-glucanasa y de la ramnogalacturonasa en el tiempo de cocción de diversos genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L). Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM
- Jacinto-Hernández C. Bernal-Lugo I, Garza GR. 2002. Food quality of drybean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from different states of Mexico.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680- 685.

Liu K. 1995. Cellular, biological, and physicochemical basis for the hard to cook defect in legume seeds. *Crit Rev Food Sci & Nutr.* 35: 263-298.

Liu EH, Lamport DT. 1974. An Accounting of horseradish peroxidase isozymes associated with the cell wall and evidence that peroxidase does not contain hydroxyproline. *Plant Phys* 54: 870-876.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall, RL. 1951. Protein measurement with the follin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 193: 265-275.

McKay J.E. 1989. The behavior of enzymes in systems of low water content. En ed. Hardman, T.M. *Water and food quality.* Cap. 5. pag 173.

Morales De León J, Bourges H, Camacho ML. 2005. Composición de aminoácidos en varios alimentos mexicanos. *ALAN.* 55: 172-186.

Morimoto S, Tateishi N, Inuyama M, Taura F, Tanaka H, Shoyama Y. 1999. Identification and molecular characterization of novel peroxidase with structural protein-like properties. *J Biol. Chem.* 274: 26192-26198.

Noah L, Guillon F, Bouchet B, Buléon A, Molis C, Gratas M, Champ M. 1998. Digestion of carbohydrate from white beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in healthy humans. *J Nutr.* 128: 977-985.

Paredes - López O, Barradas I, Reyes Moreno C. 1989. Prediction of the effect of storage conditions on water content and water activity of common beans. *J Food Sci.* 54: 1373-1374.

Reyes-Moreno C, Paredes - López O. 1993. Hard-to cook phenomenon in common beans - a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33:227-286.

Robertson E, Danelly K, Malloy P. 1987. Rapid Isoelectric Focusing in a Vertical Polyacrylamide Minigel System. *Analytical Biochemistry* 167:290-297.

Sanchez M, Peña M, Revilla G. 1996. Changes in dehydro ferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* Hypocotyl. *Plant Physiol.* 111: 941-946.

Serrano J, Goñi I. 2004. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *Archivos latinoamericanos de nutrición.* 54: 36-44.

Sigma-Aldrich. 1994. Enzimatic assay for peroxidase.

Showalter AM. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5: 9-23

Tintor Pérez I. D. J. 2011. Cuantificación de la actividad de peroxidasa, ácido ferúlico y lignina en pared celular de frijol durante su endurecimiento. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Valle Vega P, Lucas Florentino B. 2000. Toxicología de alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública. Pág. 64-69.

Vertucci C.W. 1993. Towards a unified hypothesis of seed aging. In D. Côme and F Corbineau [eds.], Fourth international workshop in seeds: basic and applied aspects in seed biology, 739-746. AFSIS, Paris

Yoshida H, Tomiyama Y, Kita S, Mizushima Y, 2005. Lipid classes, fatty acid and triacylglycerol molecular species of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107: 307-315.

Zimmerlin A, Wojtaszek P, Paul Bolwell GP. 1994. Synthesis of dehydrogenation polymers of ferulic acid with high specificity by a purified cell-wall peroxidase from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Biochem. J.* 299:747-753.

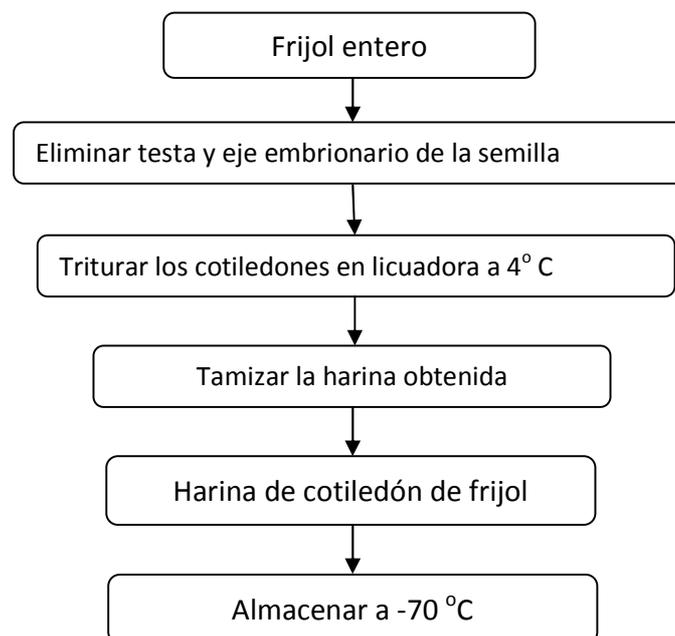
## **11. Apéndice**

### **11.1 Obtención de harina de cotiledón de semillas de frijol.**

1. Eliminar testa y eje embrionario de la semilla. Con ayuda de una navaja, cortar la semilla a la mitad y separar manualmente la testa de los cotiledones.

2. Triturar los cotiledones en licuadora a 4° C hasta obtener una harina fina.

3. Tamizar la harina obtenida mediante un tamiz de malla #40 (425 micras). Posteriormente, almacenar por separado la harina y las testas a -70° C.



**Esquema A 1.** Pasos para la obtención de harina de cotiledón de semillas de frijol

### **11.2 Extracción de enzimas de pared celular de cotiledón de frijol.**

A continuación se describen los pasos a seguir para la extracción de enzimas:

1. Colocar en un mortero 0.25 g de harina de cotiledón de frijol y homogeneizar con nitrógeno líquido.

2. El homogeneizado, transferirlo a un matraz Erlenmeyer de 25 ml que contenga 10 ml de amortiguador de acetato de sodio 0.05 M, pH 5.5, conteniendo 0.2 mM de PMSF. Agitar en placa magnética durante 5 minutos a 4° C.

3. Centrifugar 15 min a 10000 rpm (rotor Sorvall SS-34) a 4° C.

4. Transferir el sobrenadante a un matraz etiquetado como "enzimas de citoplasma", la pastilla formada se coloca en un matraz que contenga 10 ml de amortiguador de acetato de sodio 0.05 M, pH 5.5, conteniendo 0.2 mM de PMSF agitando por 5 minutos a 4°C

5. Centrifugar 15 min a 10000 rpm (rotor Sorvall SS-34) a 4° C.

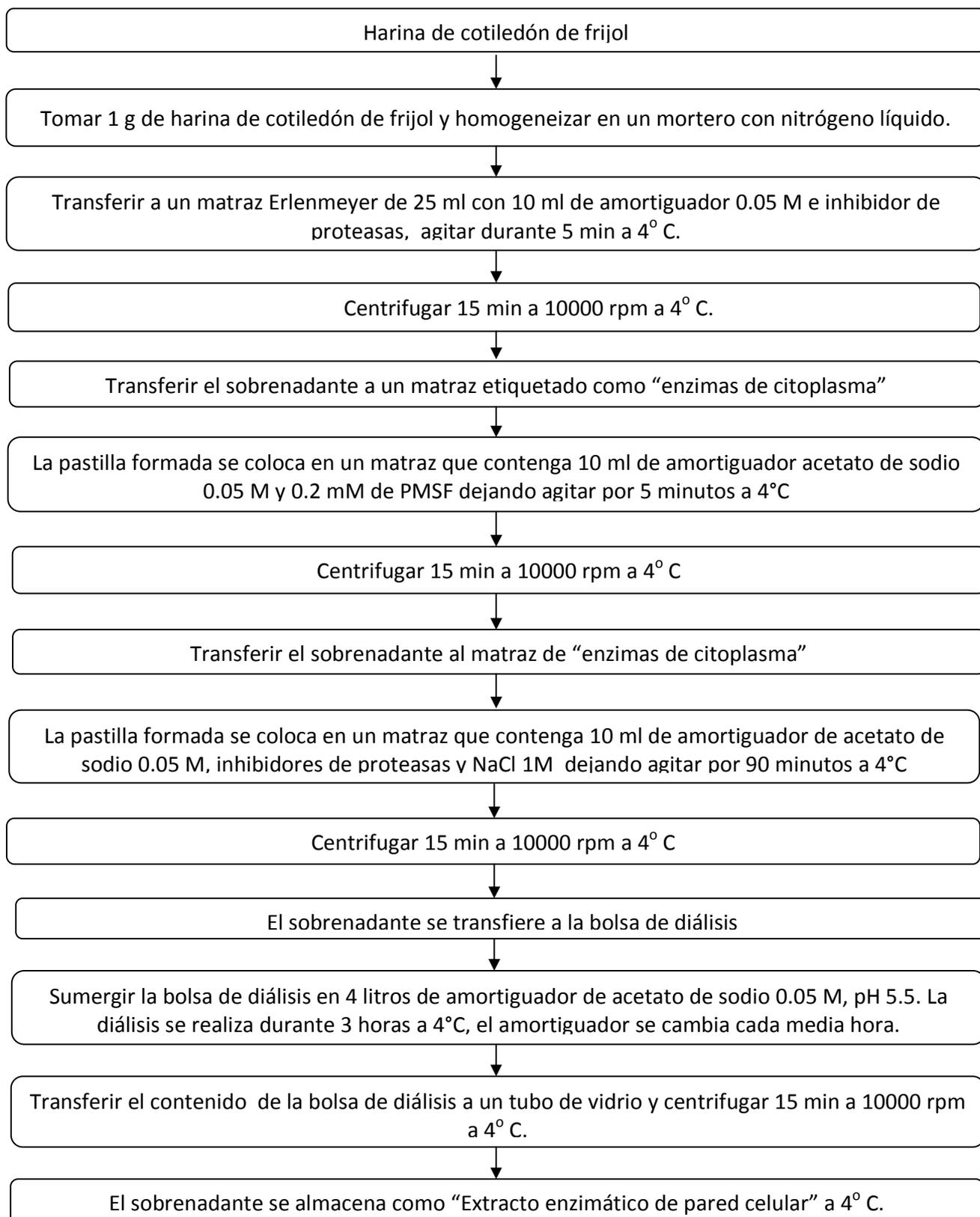
6. Transferir el sobrenadante al matraz etiquetado como "enzimas de citoplasma", la pastilla formada se coloca en un matraz que contenga 10 ml de amortiguador de acetato de sodio 0.05 M, pH 5.5, conteniendo NaCl 1M y 0.2 mM de PMSF agitando por 90 minutos a 4°C.

7. Centrifugar 15 min a 10000 rpm (rotor Sorvall SS-34) a 4° C.

8. Transferir el sobrenadante a una bolsa de diálisis (lavada durante 1 min en una solución 1 mM de EDTA en baño María).

9. Sumergir la bolsa de diálisis bien cerrada con nudos de cáñamo en 4 litros de amortiguador de acetato de sodio 0.05 M pH 5.5. La diálisis se realiza durante 3 horas mínimo a 4°C. El amortiguador se cambia cada hora.

10. Transferir el contenido de la bolsa de diálisis a un tubo de vidrio y centrifugar 15 min a 10000 rpm (rotor Sorvall SS-34) a 4° C. El sobrenadante se coloca en un tubo limpio y etiquetado como "Extracto enzimático de pared celular" y se almacena a 4° C.



**Esquema A2.** Pasos a seguir para la obtención de enzimas de pared celular de cotiledones de semillas de frijol.

### **11.3 Determinación de la actividad de peroxidasa.**

#### **11.3.1 Cinética POX vs. Pirogalol**

Disoluciones (con excepción del amortiguador todas las disoluciones deben ser frescas y mantenidas en la oscuridad).

- Amortiguador de fosfato de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 100 mM, pH 6.0.
- Peróxido de hidrógeno 0.50% ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).
- Disolución de Pirogalol 5%.
- Disolución de enzimas.

Una vez que el buffer, el peróxido y el pirogalol se han mezclado en la celda, es necesario medir la absorbancia en el espectrómetro (Shimadzu UV-visible UV-1601) y compararla con un blanco, ya que es requerido que la mezcla se estabilice antes de agregar la muestra de extracto enzimático. Al momento que la mezcla de reacción se estabiliza se agregan 0.200 ml de extracto enzimático, se mezcla nuevamente por inversión y se inicia el cronómetro para medir la absorbancia de la oxidación de pirogalol a purpurogallin que se produce en la celda de plástico. Obteniéndose así los datos de absorbancia vs. tiempo para determinar la cantidad de sustrato que la enzima convierte en producto por unidad de tiempo.

La reacción que se lleva a cabo se muestra a continuación, siendo la formación de purpurogallin la que es cuantificada espectrofotométricamente al formar un complejo colorido amarillo-café.

<b>Cuadro 23.</b> Ensayo POX- Pirogalol			
	Concentración stock	Concentración final	Volumen (μL)
Agua	--	--	570
Amortiguador fosfatos pH=5.8	100 mM	10 mM	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.5%	0.1 %	200
Pirogalol	5%	0.5 %	100
Disolución de enzimas	--	--	30
Leer el incremento de absorbancia a 420 nm, tomando lectura cada 30 segundos Coeficiente de extinción = 2640 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> , 0.00264 μM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + pirogalol	$\xrightarrow{\text{peroxidasa}}$		2H <sub>2</sub> O + Purpurogallin

### 11.3.2 Cinética POX Vs. Ácido ferúlico

Para emular la acción de la enzima peroxidasa sobre los fenoles presentes en la pared celular de las semillas de frijol. Se utilizó el ácido ferúlico debido a que es el fenol mas abundante en la pared celular del cotiledón de semillas de frijol.

Disoluciones (Preparar todas el mismo día del ensayo enzimático, excepto el buffer)

- Amortiguador de fosfato de sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 100 mM, pH 5.8.
- Peróxido de hidrógeno 5 mM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- Disolución de ácido ferúlico 2.5 mM en metanol.
- Disolución de enzimas.

**Cuadro 24.** Ensayo POX-Ácido Ferúlico.

	Concentración stock	Concentración final	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua	---	---	670
Amortiguador fosfatos pH=5.8	100 mM	10 mM	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 mM	0.5 mM	100
Ácido ferúlico	2.5 mM	0.25 mM	100
Disolución de enzimas	---	---	30

Leer el decremento de absorbancia a 310 nm, tomando lectura cada 30 segundos.  
 Coeficiente de extinción =  $14.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $0.0147 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + ácido ferúlico	$\xrightarrow{\text{POX}}$	H <sub>2</sub> O + Productos oxidados de ácido ferúlico
---	----------------------------	---

### 11.3.4 Cinética POX Vs. Orto-Dianisidina

El uso de este sustrato se justifica por su utilización en el ensayo de actividad en el zimograma, el cual requiere de un producto de reacción colorido y de fácil detección.

Disoluciones

- Amortiguador de fosfato de sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 100 mM, pH 6.0.
- Peróxido de hidrógeno 0.9 mM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- Disolución de O-Dianisidina 1 %.
- Disolución de enzimas.

<b>Cuadro 25. Ensayo POX- O-Dianisidina.</b>			
	Concentración stock	Concentración final	Volumen (μL)
Agua	--	--	720
Amortiguador	100 mM	10 mM	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.3 mM	0.015 mM	50
O-Dianisidina	1 mM	0.1 mM	100
Disolución de enzimas		--	30
Leer el incremento de absorbancia a 460 nm, tomando lectura cada 30 segundos Coeficiente de extinción = 11.3 mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> , 0.0113 μM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>			
			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Orto-Dianisidina	$\xrightarrow{\text{peroxidasa}}$		H <sub>2</sub> O + Producto oxidado

## 11.4 Cuantificación de proteína en extractos de pared celular de cotiledón.

### 11.4.1 Método Lowry.

La cantidad de proteína en los extractos enzimáticos de pared celular de cotiledón de frijol se determinó mediante el método de Lowry, el cual resulta ser un método que no requiere gran cantidad de muestra, por su reproducibilidad y porque tiene gran sensibilidad.

#### Disoluciones

- Disolución A (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, NaOH 0.4%, tartrato de sodio y potasio 0.16% y SDS 1%).
- Disolución B (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 4%).
- Reactivo de Follin (Sigma).
- Disolución de enzimas.

En tubos de ensaye se colocan 0.2 ml del extracto enzimático de frijol, 0.15 ml de agua destilada y 1 ml de disolución C (mezcla de disolución A y disolución B proporción 100:1). Se dejan incubar 10 min a temperatura ambiente y se agrega 0.1 ml de reactivo de Follin, se deja incubar 30 min a temperatura ambiente para que desarrolle color. Se leyó la absorbancia en espectrofotómetro (Shimadzu UV-visible 1601) a una longitud de onda de 660 nm. Siguiendo la misma metodología se prepara una curva estándar con una disolución de BSA dentro de un intervalo de 0 – 100 µg.

#### **11.4.2 Método Bradford**

El método Bradford, resulta ser más práctico en cuanto a los reactivos que se emplean, no pierde sensibilidad ni reproducibilidad y resulta ideal para cuantificar la cantidad de proteína en las fracciones obtenidas después de filtrar el extracto.

##### Disoluciones

- Reactivo de Bradford (BioRad)
- Disolución de enzimas.
- Agua desionizada

En tubos de ensaye limpios, se coloca 0.75 ml de agua desionizada, 0.2 ml de reactivo de Bradford y 0.05 ml de muestra a analizar, se mezclan por inversión y después de 5 minutos de reposo se vierte el ensayo en celdas de plástico y se lee la absorbancia a 595 nm, posteriormente se calcula la cantidad de proteína de acuerdo a la curva patrón realizada con albúmina.

### **11.5 Purificación de proteínas**

Para poder caracterizar las enzimas de pared celular es necesario que el extracto no contenga impurezas y la solución esté lo más translúcida posible. Se emplearon técnicas de purificación de proteínas, para aislar la enzima peroxidasa de otras presentes en la pared celular y eliminar aquella materia celular que pudiera causar interferencia en la caracterización de estas enzimas.

Es necesario contar con una buena cantidad de extracto enzimático y que éste se encuentre en condiciones óptimas. También es recomendable que las enzimas no sufran cambios drásticos de temperatura y/o pH. Por ello se optimizó el proceso de extracción cambiando el buffer y los tiempos de proceso, con respecto a las extracciones previas con el propósito de preservar la enzima en cuanto a calidad y cantidad.

A continuación se enumeran los pasos a seguir para la extracción de enzimas previos a la purificación.

1. Colocar 1 g de harina de cotiledón de frijol en un mortero y homogeneizar con nitrógeno líquido.
2. Transferir a un matraz Erlenmeyer de 25 ml que contenga 15 ml de amortiguador Tris- HCl 0.02 M, pH 7.5 conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) y PMSF 0.2 mM. Agitar durante 5 min a 4° C.
3. Centrifugar 15 min a 10000 rpm (rotor Sorvall SS-34) a 4° C.

4. Transferir el sobrenadante a un matraz etiquetado como "enzimas de citoplasma", la pastilla formada se coloca en un matraz que contenga 15 ml de amortiguador Tris- HCl 0.02 M pH 7.5, inhibidores de proteasas y PMSF 0.2 mM, agitando por 5 minutos a 4°C

5. Centrifugar 15 min a 10000 rpm (rotor Sorvall SS-34) a 4° C.

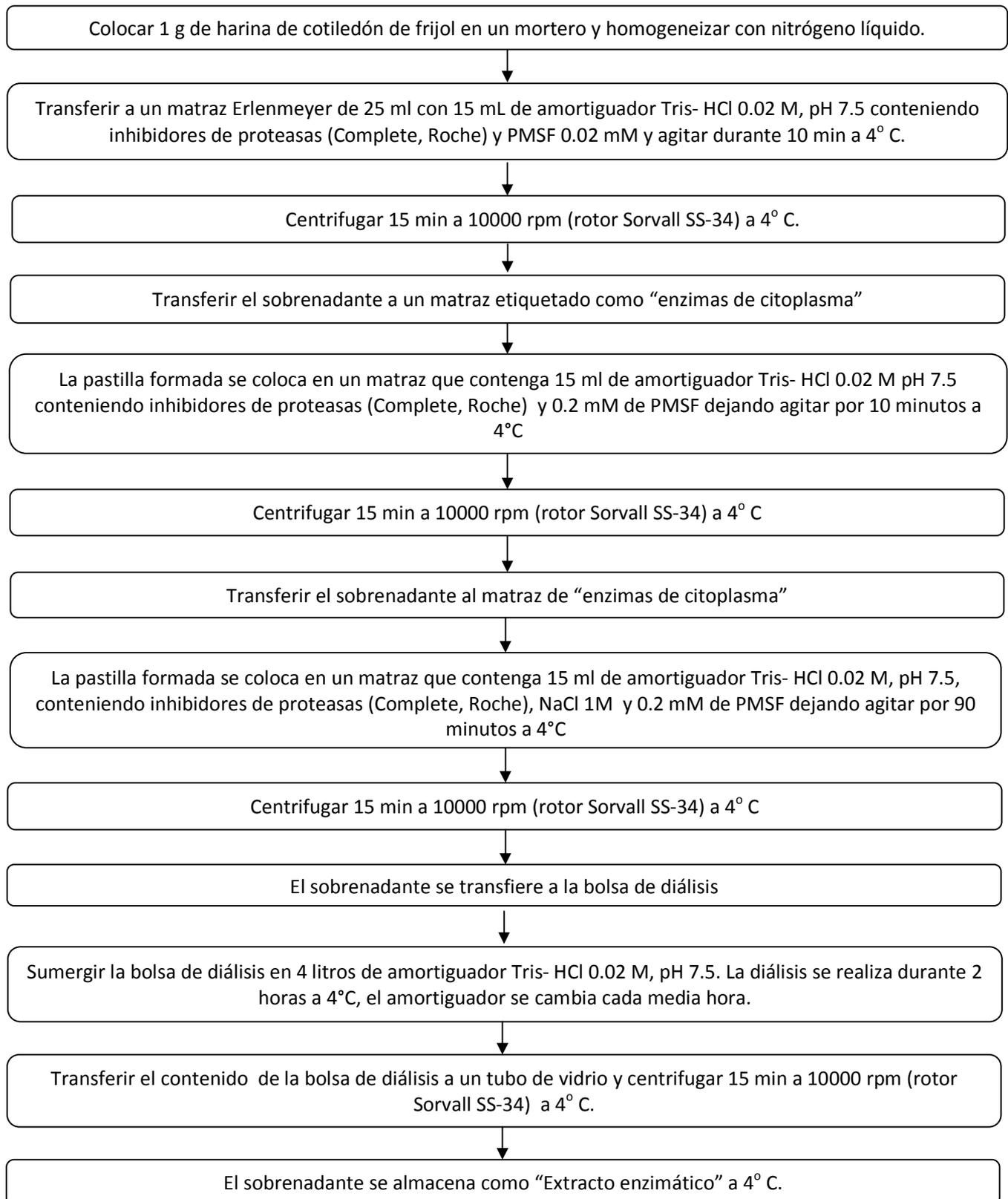
6. Transferir el sobrenadante al matraz etiquetado como "enzimas de citoplasma", la pastilla formada se coloca en un matraz que contenga 15 ml de amortiguador de Tris- HCl 0.02 M, pH 7.5, inhibidores de proteasas, PMSF 0.2 mM y NaCl 1M agitando por 90 minutos a 4°C.

7. Centrifugar 15 min a 10000 rpm a 4° C.

8. Transferir el sobrenadante a una bolsa de diálisis (lavada durante 1 min en una solución 1 mM de EDTA en baño María).

Paso 9. Sumergir la bolsa de diálisis bien cerrada con cáñamo en 4 litros de amortiguador Tris- HCl 0.02 M, pH 7.5. La diálisis se realiza durante 3 horas mínimo a 4°C. El amortiguador se cambia cada hora.

10. Transferir el contenido de la bolsa de diálisis a un tubo de vidrio. Centrifugar 15 min a 10000 rpm (rotor Sorvall SS-34) a 4° C. El sobrenadante se coloca en un tubo limpio y etiquetado como "Extracto enzimático de pared celular" y se almacena a 4° C.



**Esquema A3.** Pasos a seguir para la obtención de enzimas de pared celular de cotiledones de semillas de frijol para la purificación de peroxidasa.

### **11.6 Precipitación de proteínas con sulfato de amonio**

Muchas proteínas son solubles en agua y su solubilidad se modifica al modificar la fuerza iónica de la solución. La sal de uso común para este propósito es sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ , debido a su alta solubilidad, incluso a temperaturas de  $4^\circ\text{C}$ , que es la temperatura a la cual deben manejarse las enzimas para evitar pérdida de actividad. El mecanismo mediante el cual el sulfato de amonio es capaz de precipitar proteínas es el siguiente: las proteínas en soluciones acuosas están muy hidratadas, y con la adición del sulfato de amonio, las moléculas de agua cada vez son más atraídas por la sal que por la proteína, debido a que la carga de la primera es más alta. Esta competencia para la hidratación suele ser más favorable a la sal, que conduce a la interacción entre las proteínas, lo que resulta en su agregación y, finalmente, su precipitación. El precipitado es colectado por centrifugación y el sedimento de proteína se vuelve a disolver en un volumen menor de un amortiguador apropiado. Dado que las proteínas tienen diferentes características, es a menudo que precipiten a una particular concentración de sal.

<b>Cuadro 26.</b> Cantidades de sulfato de amonio requeridas para precipitación de proteínas.																	
Concentración inicial de sulfato de amonio (%)	Porcentaje de saturación a 0 °C																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Sulfato de amonio solido (gramos) para ser añadidos a 1 litro de solución.																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

### 11.7 Cromatografía de intercambio Iónico

Esta metodología consiste en aplicar la disolución de proteínas en la parte superior de una columna empacada con una resina que está cargada de tal forma, que las proteínas en la disolución que presenten carga opuesta a la de la resina se quedan unidas a la columna por interacciones iónicas, ya que cada proteína presenta un número de cargas diferente, cada proteína se une con diferente fuerza a la columna; las que tienen carga similar a la columna no se unen. Estas proteínas fluyen de la columna, al lavarla con el mismo

amortiguador en el que se disolvieron las proteínas. Para eluir las proteínas que se pegaron a la columna, se aplica un gradiente de NaCl, de forma tal que dependiendo de la fuerza de unión de la proteína a la resina será la concentración de NaCl requerida para eluirla. Durante todo el proceso de cromatografía se colecta el flujo, mediante un colector de fracciones. Y así se colecta en tubos de ensaye: todo el buffer que pasa por la columna, la parte del extracto que no se adhiere a la columna, el extracto que sí se adhirió y un remanente de buffer. Posteriormente, cada fracción se evalúa en cuanto a su contenido de proteína y actividad enzimática.

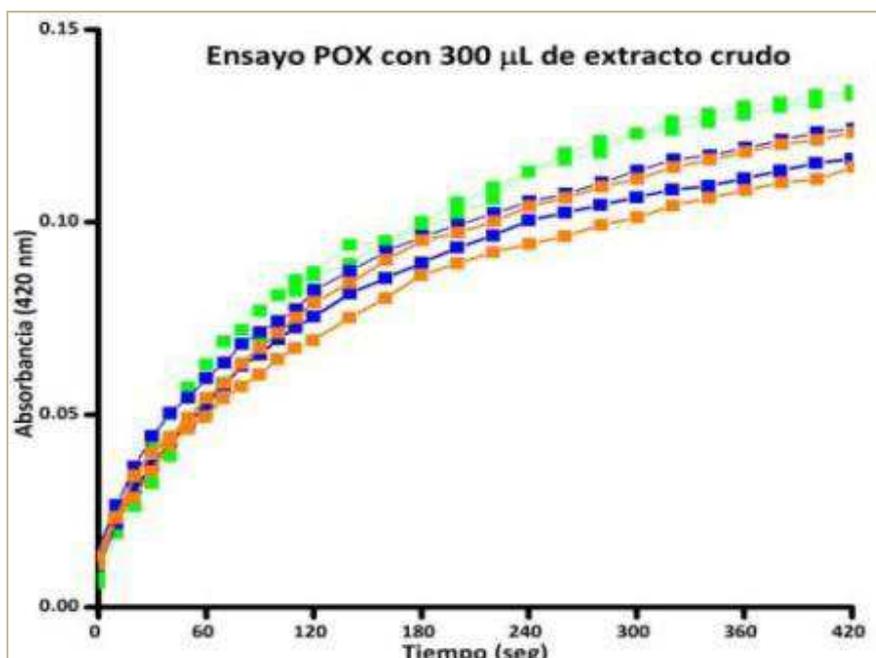
### **11.8 Liofilización**

Este paso sirve principalmente para reducir el volumen de la muestra sin perder proteína, ni actividad, es decir, concentrar. El proceso se lleva a cabo mediante la sublimación del agua del medio. Para que sublime, la muestra se congela y después se somete a "presión negativa". La muestra se congela con nitrógeno líquido y el vaso se cubre con papel poroso para que al cambiar la presión, la muestra no se pierda. Es así como el agua se elimina de la muestra, conservando la proteína original, pero también se conserva cualquier soluto, incluyendo el del buffer agregado en la extracción, de tal forma que es prudente una diálisis posterior.

### 11.9 Optimización del ensayo para la cuantificación de peroxidasa de pared celular

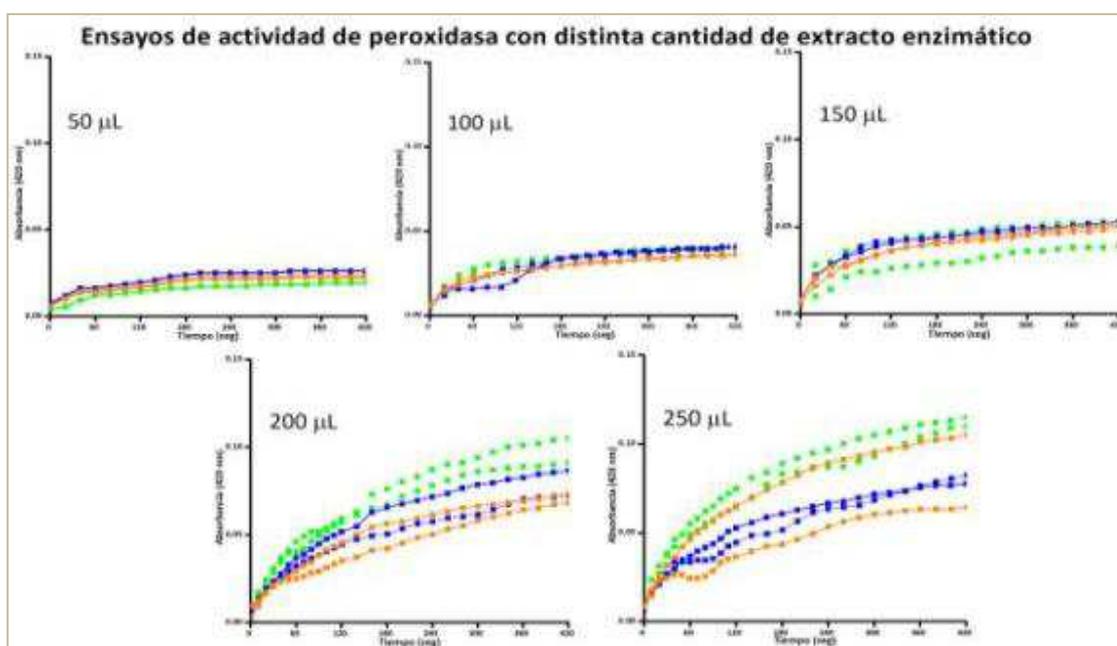
Las enzimas de pared celular se extrajeron del cultivar Negro Jamapa con alta fuerza iónica y para separarlas de las globulinas que constituyen el 30 % de la proteína de reserva, el extracto se dializó con amortiguador sin sal, con lo cual solo las globulinas se precipitaron en la bolsa de diálisis. Las globulinas se separan por centrifugación y el sobrenadante constituyó la fuente de la peroxidasa. Esta actividad se ensayó utilizando como sustrato pirogalol (apéndice, cuadro A!).

Para definir la alícuota de enzima a ensayar se utilizaron, como primera aproximación, 300  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático antes descrito y la reacción se siguió en el espectrofotómetro. EL resultado de este ensayo se muestra en la figura 24.



**Figura 24.** Ensayo de actividad de peroxidasa con pirogalol como sustrato.

En la figura 24 se detectan dos pendientes, una rápida de 0-120 seg y la otra más lenta de 120 a 300 seg. Lo anterior indicaba que la cantidad de enzima en el ensayo era excesiva para la concentración de sustratos que se estaban utilizando y muy probablemente después de 120 seg la enzima ya no estaba saturada o bien indicaba la presencia de dos enzimas. Por lo que se decidió preparar una muestra por triplicado y realizar el ensayo con diferentes volúmenes de extracto. En la figura 25, se muestran las cinéticas obtenidas con los diferentes volúmenes de extracto enzimático utilizado. En las gráficas cada color indica el duplicado de una réplica y los diferentes colores las diversas réplicas.



**Figura 25.** Cinética de Peroxidasa de pared celular de cotiledones de frijol.

De nuevo, en la figura 25 se observa que independientemente del volumen utilizado, las gráficas presentaron dos pendientes, las cuales fueron

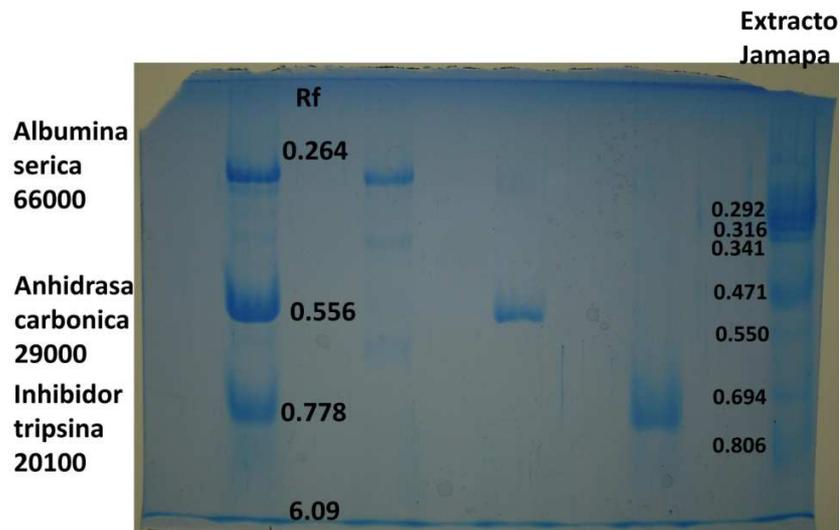
calculadas y se muestran en el cuadro 27. Cabe hacer notar que la pendiente de 0-120 seg se incrementó en forma lineal respecto al volumen ensayado de enzima, mientras que la segunda pendiente (121-300 seg) no siguió esta tendencia. De los resultados anteriores se determinó que con 200  $\mu$ l de extracto enzimático se podía obtener una buena respuesta de la actividad con la menor cantidad de extracto. También se decidió tomar solamente la actividad en los dos primeros minutos, para calcular la pendiente, haciendo lecturas cada 10 segundos.

**Cuadro 27.** Valores promedio de pendientes en ensayos de actividad de POX de los duplicados para cada extracto empleando diferentes cantidades de extracto.

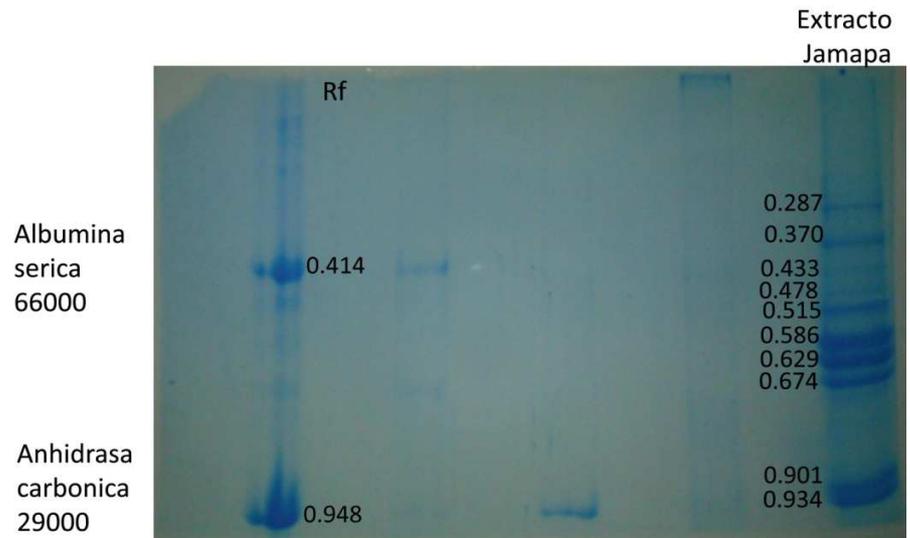
Cantidad de extracto enzimático	Extracto	Pendiente ( $\Delta$ abs/seg)		Pendiente ( $\Delta$ abs/min)	
		Minuto 0 al 2	Minuto 3 al 7	Minuto 0 al 2	Minuto 3 al 7
50	I	0.000085	0.000013	0.0051	0.0008
	II	0.00007	0.000014	0.0042	0.0008
	III	0.000095	0.000019	0.0057	0.0011
100	I	0.000203	0.000028	0.0122	0.0017
	II	0.000137	0.000037	0.0082	0.0022
	III	0.000154	0.000031	0.0092	0.0019
150	I	0.000215	0.000039	0.0129	0.0023
	II	0.000262	0.000034	0.0157	0.0020
	III	0.000217	0.000042	0.0130	0.0025
200	I	0.000388	0.000122	0.0233	0.0073
	II	0.000342	0.000098	0.0205	0.0059
	III	0.000262	0.000095	0.0157	0.0057
250	I	0.000461	0.000125	0.0277	0.0075
	II	0.00029	0.000101	0.0174	0.0061
	III	0.000316	0.000107	0.0190	0.0064
300	I	0.000629	0.000154	0.0377	0.0092
	II	0.000515	0.000125	0.0309	0.0075
	III	0.000483	0.000131	0.0290	0.0079

### 11.10 Geles de poliacrilamida

Para confirmar el peso molecular de la peroxidasa purificada, se realizaron geles de poliacrilamida al 12 % (Fig. 26) y al 10 % (Fig. 27) y con proteínas estandarizadas de peso molecular conocido. De las bandas obtenidas en cada gel se calculó el Rf (distancia del origen a la banda/distancia recorrida por el azul de bromofenol) y se graficó vs el logaritmo del peso molecular de la proteína patrón (ilustración 26 y 27). Posteriormente mediante la regresión lineal de la gráfica, se calculó el peso molecular de las bandas en cada gel con el porcentaje de acrilamida correspondiente.



**Figura 26.** Gel de poliacrilamida 12% con tres proteínas estandarizadas que se emplearon como marcadores de peso molecular.



**Figura 27.** Gel de Poliacrilamida al 10% en el cual se cargaron las mismas muestras que en el gel de la figura 26, en este gel, se observan las bandas correspondientes a solo dos de las tres proteínas estándar.