



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LAS ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA
DEGRADACIÓN DE ALMIDÓN EN VAINAS DE FRUTOS
DE FRIJOL**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO EN ALIMENTOS
PRESENTA
DAVID ISRAEL ABOYTES REA

DIRECTOR DE TESIS
DR. J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS



CIUDAD DE MÉXICO

2016



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: Dra. Marina Gavilanes Ruiz

VOCAL: Dr. J. Eleazar Martínez Barajas

SECRETARIO: Dr. Euclides Avila Chávez

1er. SUPLENTE: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

2º SUPLENTE: Dra. Claudia Teresa Tovar Palacio

Trabajo realizado en el laboratorio 102 del Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.
Ciudad Universitaria, Ciudad de México.

Asesor del tema: Dr. J. Eleazar Martínez Barajas _____

Sustentante: David Israel Aboytes Rea _____

Agradecimientos. Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA) al proyecto IN214314: Participación de SnRK1 en la implementación de estrategias metabólicas que favorezcan el desarrollo de semillas de frijol en condiciones ambientales adversas y CONACYT proyecto de equipamiento 252001.

<i>ÍNDICE</i>	<i>Páginas</i>
ÍNDICE.....	1
RESUMEN.....	2
1.- INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. ENZIMAS.....	5
1.1.1. AMILASAS.....	5
1.2. USOS INDUSTRIALES DE α -AMILASAS.....	7
2.- PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS AMILASAS VEGETALES.....	10
2.1. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	10
3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
4.- METODOLOGÍA.....	14
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	14
4.2. ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE α -AMILASA POR LA DEGRADACIÓN DE ALMIDÓN-AZURE.....	15
4.3. ZIMOGRAMAS.....	16
4.4. IDENTIFICACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS RESPONSABLES DE LA DEGRADACIÓN DEL ALMIDÓN.....	17
4.5. PURIFICACIÓN DE α -AMILASA.....	19
4.6. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO.....	21
4.6.1. INMUNOANÁLISIS.....	22
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
5.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA.....	23
5.2. IDENTIDAD DE LAS ENZIMAS RESPONSABLES DE LA DEGRADACIÓN DE ALMIDÓN EN LAS VAINAS DE LOS FRUTOS DE FRIJOL.....	27
5.3. PURIFICACIÓN PARCIAL DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS.....	28
6.- CONCLUSIONES.....	38
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	39

RESUMEN

La semilla de frijol está compuesta principalmente por carbohidratos y proteínas que la planta produce a partir de la actividad fotosintética que realiza en las hojas. En este trabajo se analizó la capacidad tres genotipos de *Phaseolus vulgaris* para degradar el almidón acumulado en las vainas que protegen las semillas. Dado que los productos de la degradación del almidón pueden ser usados para favorecer el desarrollo de las semillas en situaciones donde el suministro de nutrimentos no es suficiente, creemos que la actividad de las enzimas participantes podría ser un buen indicador de la capacidad de los genotipos para enfrentar ambientes extremos. Se identificaron a la α y β -amilasa como las enzimas responsables de la movilización de carbohidratos. Todos los genotipos respondieron incrementando la actividad de las mismas como consecuencia de la reducción en el suministro de nutrimentos. Sin embargo, un análisis por Western-blot sugiere que pudieran existir diferencias importantes en las características de las enzimas amilolíticas inducidas en los diferentes genotipos.

Se probaron varios métodos para la purificación de la α -amilasa. De todos ellos, la cromatografía de afinidad dio los mejores resultados pues en pocos pasos se pudo obtener una preparación enzimática con alto grado de pureza. Por inmunoanálisis se detectó que la actividad de α -amilasa está asociada a la presencia de proteínas de 46 y 75 kDa, mientras que la proteína con actividad de β -amilasa es dependiente de una proteína de 60 kDa.

1.- INTRODUCCIÓN

Phaseolus vulgaris es una planta herbácea anual, cuyos frutos tiernos (ejotes) y semillas son uno de los alimentos más antiguos conocidos por el hombre en el Continente Americano y que desde tiempos remotos es componente esencial de la dieta de muchas personas. De manera general puede afirmarse que este cultivo prospera en zonas con un rango de temperatura entre 20 y 28°C, prefiriendo suelos ligeros, con buen drenaje y ricos en materia orgánica. Sin embargo, México está ubicado en el centro de domesticación de este cultivo y la gran diversidad genética disponible permite encontrar genotipos adaptados a condiciones ambientales y de cultivo más diversas.

Este es uno de los cultivos de mayor importancia en el país, sus semillas son una de las principales fuentes de proteína para amplias capas de la población mexicana (SIAP, SAGARPA, 2005), y para muchos productores representa una fuente importante de ocupación e ingreso, a la vez que es una garantía de seguridad alimentaria. Los frutos tiernos (ejote) son una hortaliza de alto valor nutricional que se preparan de distintas maneras y que por su precio están al alcance de todos los estratos sociales. Se estima que 100 g de ejotes contienen 2.4 g de proteína y 8.1 g de carbohidratos digeribles (principalmente almidón) y un alto contenido de vitaminas y minerales. Por su parte, las semillas de frijol, como la mayoría de las legumbres, representa una fuente rica y variada de nutrimentos imprescindibles para el organismo, pues 100 g contienen 23.4 g de proteína, equivalente al 50% de la IDR (Ingesta Diaria Recomendada), y 45.1 g de carbohidratos digeribles, además de su alto contenido de minerales como hierro, magnesio, potasio y vitaminas del complejo B (López, 2004).

En el ciclo de vida de las plantas de frijol se identifican dos fases: vegetativa y reproductiva. La vegetativa comprende desde el momento de la siembra de la semilla hasta el surgimiento de las primeras flores; se caracteriza por el rápido aumento de la materia seca, pues la planta invierte su energía en la formación de tejidos que realizan la absorción de nutrimentos y fotosíntesis. La fase reproductiva se inicia con la aparición de las primeras flores y termina cuando los frutos están listos para la cosecha (Virgilio, 2003).

En México la producción de frijol se concentra en los estados de Zacatecas, Sinaloa, Durango, Chihuahua, Nayarit y Chiapas (cuya producción combinada representa alrededor del 70% del volumen de la producción nacional), es predominantemente de temporal y por lo tanto, muy vulnerable a cambios en las condiciones climáticas (SHCP, FND, 2014). De manera general, los factores que afectan la producción de frijol pueden ser clasificados en abióticos y bióticos; dentro de los factores abióticos destacan la sequía, temperaturas extremas (las altas temperaturas inducen la caída de los órganos reproductivos y reducen el rendimiento, mientras que las bajas retardan el crecimiento de las plantas) y el empobrecimiento de suelos. Por su parte, los factores bióticos más importantes son las enfermedades causadas por hongos y, en menor grado, las producidas por bacterias y virus, los ataques de plagas y la presencia de malezas. De las enfermedades que impactan de manera sustancial la producción de frijol en México se encuentran: las pudriciones de raíz, la antracnosis (manchas de diferentes colores), la bacteriosis y la roya (Treviño y Rosas, 2013).

La respuesta de las plantas a condiciones ambientales adversas depende de la etapa de desarrollo, naturaleza, duración y severidad del estrés (Pessarakli, 2001). Generalmente las respuestas son altamente dependientes del genotipo.

La riqueza genética disponible en México es enorme. Algunas colecciones de frijol se han estudiado detalladamente y se cuenta con excelentes descripciones de sus características morfológicas y de producción. Sin embargo, hace falta el conocimiento de las bases moleculares y fisiológicas que determinan su respuesta a distintos tipos de estrés bióticos y abióticos (Ligarreto, 2013). La información al respecto, será de gran utilidad para implementar programas de mejora genética. Diversas proyecciones sugieren que en un futuro cercano las condiciones climáticas del planeta sufrirán cambios muy importantes. Como consecuencia, amplias regiones del país se verán afectadas por el aumento de la temperatura promedio y la reducción de las precipitaciones. Para garantizar la seguridad alimentaria de nuestro país es necesario obtener cultivares capaces de producir buenas cosechas bajo condiciones ambientales adversas.

1.1. ENZIMAS

Las enzimas son biocatalizadores que aceleran reacciones químicas. Dada su naturaleza proteica, existe una estrecha relación entre su estructura y la función que realizan. Gracias a ello, también es posible entender la alta especificidad por sus sustratos y la manera tan efectiva de cómo se regula su actividad dentro de las células.

Las enzimas se pueden clasificar de acuerdo a la reacción que catalizan (Koolman y Heinrich, 2004):

- Oxidoreductasas: catalizan la transferencia de los equivalentes reductores entre dos sistemas redox.
- Transferasas: catalizan la transferencia de otros grupos de una molécula a otra.
- Hidrolasas: transfieren grupos y el aceptor siempre es una molécula de agua.
- Liasas: llamadas con frecuencia “sintasas”, catalizan la ruptura o formación de uniones químicas, con la formación o eliminación de enlaces dobles.
- Isomerasas: desplazan grupos dentro de una molécula sin cambiar la fórmula general del sustrato.
- Ligasas: llevan a cabo reacciones de unión de moléculas dependientes de la energía y por eso siempre están acopladas con la hidrólisis de nucleósidos trifosfatos.

1.1.1. AMILASAS

También denominadas diastasas. Son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces α 1-4 de polisacáridos tales como el almidón y el glucógeno para formar azúcares simples. Las amilasas son enzimas abundantes en la naturaleza, pues células animales, vegetales, así como bacterias y hongos son capaces de producirlas (Anthea, Hopkins, et.al., 1993).

De acuerdo a la manera como la cadena del polisacárido es hidrolizada, las amilasas se dividen en α -amilasa, β -amilasa y γ -amilasa. Las α -amilasas son enzimas dependientes de calcio que hidrolizan aleatoriamente el enlace α 1-4 a lo largo del polisacárido produciendo maltotriosa, maltosa, glucosa y dextrinas límite. Las β -amilasas se acoplan en

el extremo no reductor de la cadena e hidrolizan el segundo enlace α 1-4, produciendo unidades de maltosa, en la figura 1 se aprecia el arreglo de la estructura de las α y β -amilasas. Por su parte, las γ -amilasas catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α 1-6 así como a los α 1-4 de los extremos no reductores, produciendo únicamente glucosa (Anthea, Hopkins, et.al., 1993).

Debido a su capacidad para actuar en cualquier sitio de la cadena, generalmente las α -amilasas son más activas que las β -amilasas y γ -amilasas (Anthea, Hopkins, et.al., 1993).

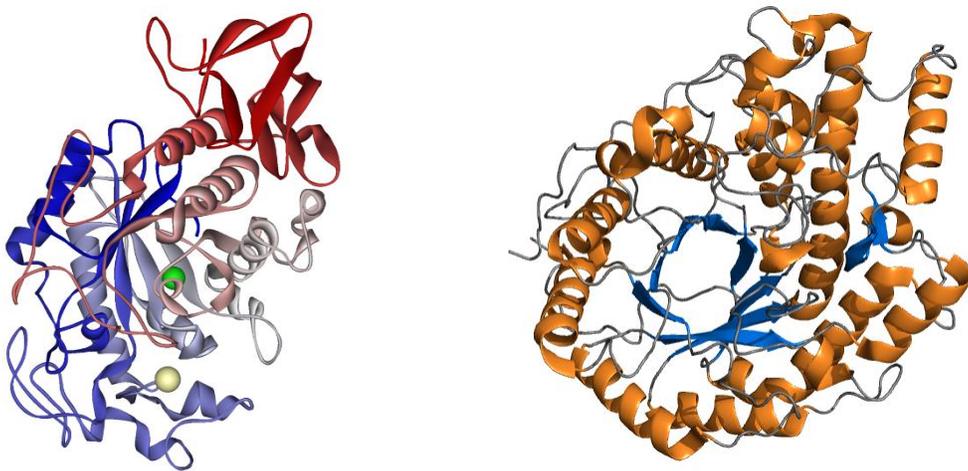


Figura 1. (Izquierda) α -amilasa de la saliva humana, ión calcio visible en blanco, ión cloruro visible en verde. (Derecha) β -amilasa de la cebada (Ramasubbu, Paloth, et.al., 1996).

En general, la actividad de amilasas (α -amilasa como β -amilasa) es elevada durante la germinación de las semillas. Su acción permite convertir al almidón en glucosa como se muestra en la figura 2.

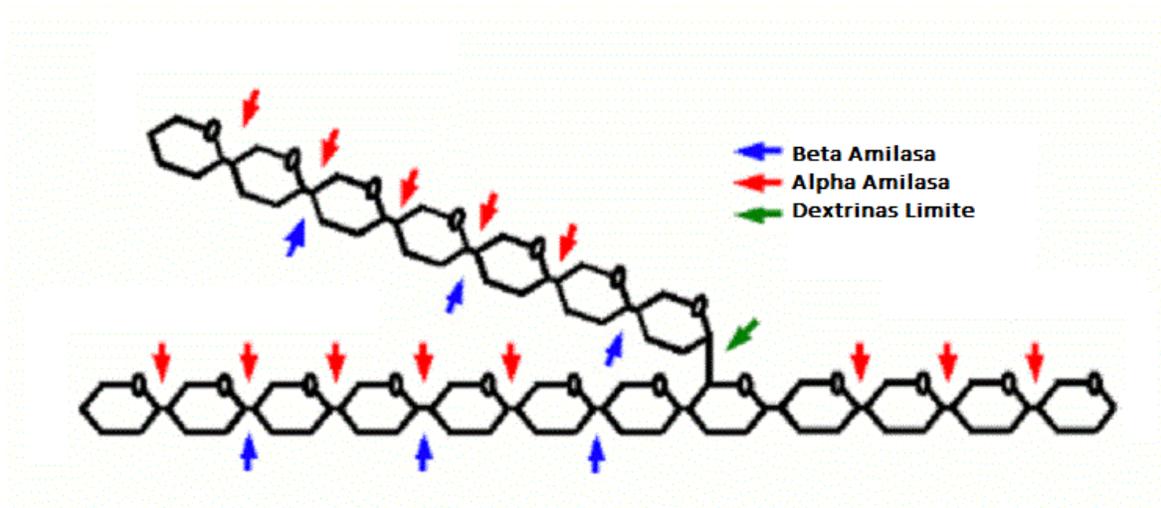


Figura 2. Sitios de ataque (hidrólisis) de un glucano ramificado por amilasas. Los sitios cuya hidrólisis es catalizada por las diferentes amilasas están representados con los siguientes colores. En rojo enlaces α 1-4 hidrolizados por α -amilasa; en azul los sitios α 1-4 hidrolizados por β -amilasa y en verde enlaces α 1-6 en donde actúa la γ -amilasa (Anthea, Hopkins, et.al., 1993).

1.2. USOS INDUSTRIALES DE α -AMILASAS

Las α -amilasas son enzimas muy estudiadas y de gran importancia en los campos biotecnológico e industrial: su uso ha reemplazado por completo la hidrólisis química del almidón y en la actualidad son imprescindibles en la elaboración de productos alimenticios, combustibles, medicamentos y detergentes. Las α -amilasas pueden ser purificadas de diferentes organismos (plantas, animales, hongos y bacterias). Actualmente, un gran número de α -amilasas bacterianas (en especial del género *Bacillus*) están disponibles comercialmente y son ampliamente utilizadas en distintos procesos industriales. Sin embargo, la demanda mundial por estas enzimas se ha incrementado en los últimos dos años y la producción actual no es suficiente para satisfacer los requerimientos industriales. Por otro lado, el empleo de α -amilasas bacterianas ha provocado alergias afectando al 15% de la población mundial y es necesario encontrar otras fuentes (Bedón, Nolasco, et.al., 2013). En este contexto, las amilasas de origen vegetal representan una alternativa que debería ser evaluada. En la tabla 1, se presentan algunas características de α -amilasas purificadas de especies vegetales.

Tabla 1. Estudios sobre α -amilasas vegetales.

Organismo	Metodología	Características	Referencia
<i>Pisum sativum</i> L.	PURIFICACIÓN: Cromatografía de afinidad (amilosa y cicloheptaamilosa) CARACTERIZACIÓN: Polarimetría, especificidad a sustrato, análisis de productos finales, SDS-PAGE.	PESO MOLECULAR: 43.5 kDa ESTABILIDAD TÉRMICA: hasta 70 °C	Beers y Duke, 1990.
<i>Mucuna pruriens</i>	PURIFICACIÓN: Precipitación con sulfato de amonio 80%, cromatografía de intercambio iónico en CM-celulosa y sephadex G-75 CARACTERIZACIÓN: PAGE nativo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque.	PESO MOLECULAR: 78.4 kDa ESTABILIDAD TÉRMICA: hasta 80 °C	Chandrashekharaiyah, Krishna, et.al., 2013.
<i>Chenopodium quinoa</i>	PURIFICACIÓN: Precipitación con sulfato de amonio 45% y posteriormente 60% al sobrenadante. CARACTERIZACIÓN: SDS-PAGE, método Miller.	PESO MOLECULAR: 44 kDa ESTABILIDAD TÉRMICA: hasta 100 °C	Bedón, Nolasco, et.al., 2013.
<i>Vigna radiata</i>	PURIFICACIÓN: Precipitación con sulfato de amonio 30-50%, cromatografía de afinidad (β -ciclodextrina) CARACTERIZACIÓN: SDS-PAGE, Western blot.	PESO MOLECULAR: 46 kDa ESTABILIDAD TÉRMICA: hasta 75 °C	Tripathi, Leggio, et.al., 2007.

<i>Phaseolus aconitifolius</i>	<p>PURIFICACIÓN: Precipitación con sulfato de amonio 80%, precipitación con acetona 70%.</p> <p>CARACTERIZACIÓN: SDS-PAGE, método Miller.</p>	<p>PESO MOLECULAR: 46 kDa</p> <p>ESTABILIDAD TÉRMICA: hasta 80 °C</p>	Chavan y Wadatkar, 2014.
<i>Salvadora persica</i>	<p>PURIFICACIÓN: Cromatografía en columna DEAE-Sepharose.</p> <p>CARACTERIZACIÓN: SDS-PAGE, filtración en gel Sephacryl S-200, método Miller.</p>	<p>PESO MOLECULAR: 74 kDa</p> <p>ESTABILIDAD TÉRMICA: hasta 80 °C</p>	Mohamed, Almulaiky, et.al., 2014.

2.- PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS AMILASAS VEGETALES

El almidón es una sustancia de reserva que las plantas almacenan en grandes cantidades en raíces, tubérculos, frutas y semillas. Además de su importancia en la fisiología de las plantas, es una fuente de energía fundamental para la alimentación de los seres humanos. A diferencia de los otros hidratos de carbono presentes en la naturaleza, el almidón se presenta como un conjunto de gránulos o partículas cuyas características dependen tanto de la especie como de las condiciones ambientales prevalecientes (Gómez, 2003). Sintetizado a partir del dióxido de carbono que toman de la atmósfera y del agua del suelo, las moléculas de almidón pueden llegar a estar constituidas por 2000 o 3000 unidades de glucosa (Gómez, 2003).

Cada año las cosechas sufren grandes pérdidas debidas a condiciones ambientales adversas (heladas, sequías e inundaciones) que se presentan durante la etapa de desarrollo de las semillas. Sin embargo, se ha observado que algunas variedades de *Phaseolus vulgaris* son más susceptibles que otras. Este hecho se atribuye a la capacidad de la planta de movilizar reservas (principalmente en forma de almidón y proteína) acumuladas en otros órganos, para promover el crecimiento de algunas semillas, las cuales al ser capaces de germinar, garantizan la preservación de la especie (Coello y Martínez-Barajas, 2014). La identificación de los genotipos más eficaces para realizar este proceso, presenta la oportunidad de concebir cultivos más resistentes a este tipo de adversidades (Walbot y Clutter, 1972).

Dependiendo de la disponibilidad de nutrimentos para el desarrollo de la semilla, la vaina puede acumular sustancias de reserva que en condiciones de estrés se convierten en carbohidratos y aminoácidos que se canalizan a las semillas en desarrollo.

2.1. ANTECEDENTES DIRECTOS

Previamente hemos observado que las vainas de los frutos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) pueden acumular cantidades importantes de almidón. Sin embargo, en la Figura 3 se observa que existen notables diferencias en la capacidad de diferentes genotipos para degradarlo cuando las condiciones ambientales son adversas (González-Castro, 2015).

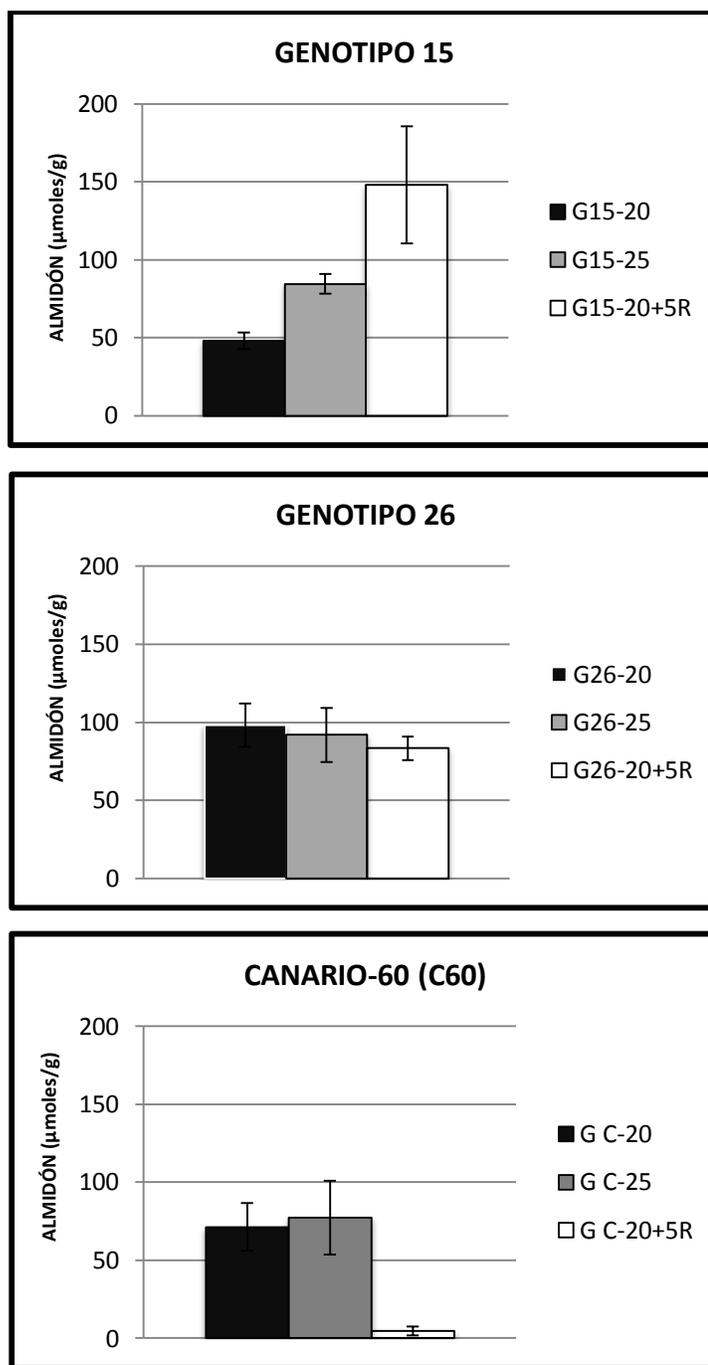


Figura 3. Almidón presente en las vainas de frutos de frijol que se desarrollaron normalmente por 20 y 25 días después de la floración (barras negras y grises, respectivamente), y en vainas de frutos que se removieron de la planta a los 20 días después de la floración y que se incubaron en oscuridad por 5 días antes de ser analizados (barras blancas) (González-Castro, 2015).

Dado que la removilización efectiva de las reservas acumuladas en las vainas de los frutos de frijol puede representar una ventaja muy importante para el desarrollo de las semillas de frijol bajo condiciones ambientales hostiles, consideramos muy importante analizar detalladamente las características de las enzimas involucradas en el proceso.

3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Cuando condiciones ambientales adversas limitan la disponibilidad de los nutrimentos necesarios para el desarrollo de las semillas, en las vainas de los frutos de la planta de frijol se activan sistemas enzimáticos que promueven la degradación de almidón acumulado con anterioridad. Los genotipos de frijol con mayor capacidad para removilizar el almidón acumulado en las vainas de sus frutos inducen enzimas amilolíticas más eficientes.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar y caracterizar la actividad amilolítica en vainas de tres genotipos de *Phaseolus vulgaris* durante de desarrollo normal de las semillas y en respuesta a una reducción drástica en el flujo de los nutrimentos necesarios para completar exitosamente el proceso.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar la actividad amilolítica presente en extractos de vainas de frutos que se desarrollan normalmente y en aquellos que se sometieron a una deficiencia severa en la disponibilidad de nutrimentos al ser removidos de la planta a 20 días después de la floración
- Identificar qué tipo de actividad amilolítica se induce en ambos casos.
- Purificar y concentrar las enzimas responsables de la actividad amilolítica.

4.- METODOLOGÍA

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para este estudio se seleccionaron los genotipos Canario-60, G26 y G15. Las semillas se germinaron en papel húmedo a una temperatura de 25 °C y después fueron trasplantadas a macetas con 3 L de agrolita. Las plantas se cultivaron en un invernadero donde las temperaturas promedio fueron 25 °C durante el día y 18 °C durante la noche. Todos los días se regaron con agua desionizada y cada tercer día con 200 mL de solución de Hoagland, constituida por KNO₃ 3 mM, Ca(NO₃)₂ 2 mM, MgSO₄ 1 mM, MnCl₂ 0.004 mM, H₃BO₃ 0.023 mM, ZnSO₄ 0.0004 mM, CuSO₄ 0.00015 mM, H₂MoO₄ 0.00005 mM y 5 gL⁻¹ de FeEDTA (Jones, 1982). Las flores se marcaron el día en que se abrieron y la edad de los frutos se estableció en días después de la floración (DDF). En la tabla 2 se detallan las características de las muestras analizadas. En la figura 4 se muestra un diagrama general de la metodología empleada.

Tabla 2. Identificación de las muestras y códigos utilizados.

Muestra	Característica	Muestra	Característica
20	Vaina cortada a los 20 días después de la floración y almacenada a -70 °C.		
21	Vaina cortada a los 21 días después de la floración y almacenada a -70 °C.	20 + 1R	Vaina cortada a los 20 días después de la floración e incubada en oscuridad por 1 día antes de ser almacenada a -70 °C.
22	Vaina cortada a los 22 días después de la floración y almacenada a -70 °C.	20 + 2R	Vaina cortada a los 20 días después de la floración e incubada en oscuridad por 2 días antes de ser almacenada a -70 °C.
23	Vaina cortada a los 23 días después de la floración y almacenada a -70 °C.	20 + 3R	Vaina cortada a los 20 días después de la floración e incubada por 3 días en oscuridad antes de ser almacenada a -70 °C.

25	Vaina cortada a los 25 días después de la floración y almacenada a -70 °C.	20 + 5R	Vaina cortada a los 20 días después de la floración e incubada por 5 días en oscuridad antes de ser almacenada a -70 °C.
----	--	---------	--

La letra R precedida por un número indica que la muestra fue removida de la planta e incubada en oscuridad por dicho número de días antes de su almacenamiento a -70 °C.

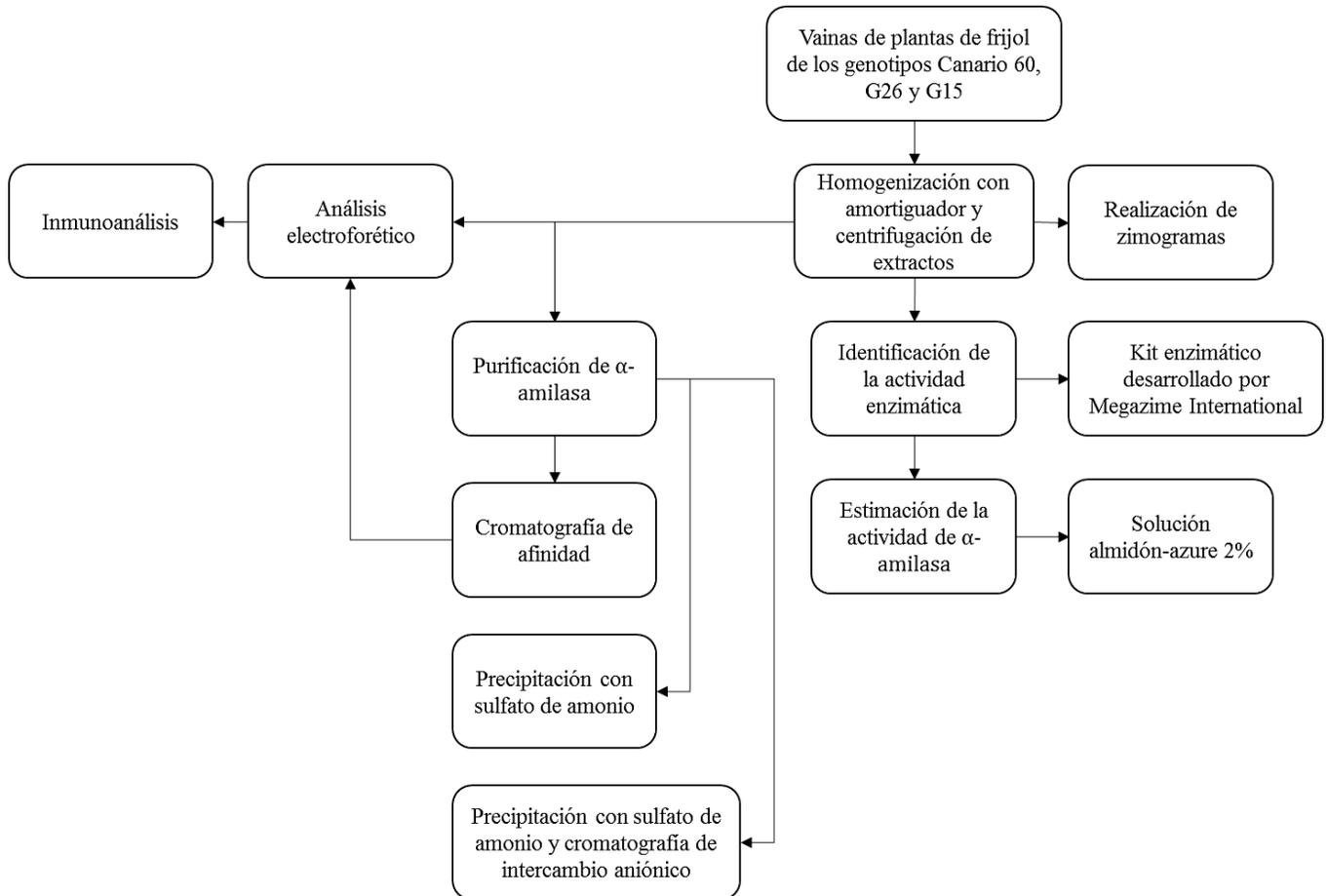


Figura 4. Diagrama general de la metodología.

4.2. ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE α -AMILASA POR LA DEGRADACIÓN DE ALMIDÓN-AZURE

El almidón-azure se obtiene al unir covalentemente con azul brillante de remazol a almidón de maíz (Figura 7). Este producto es utilizado como sustrato específico para la determinación de α -amilasa (Doehlert y Duke, 1983).

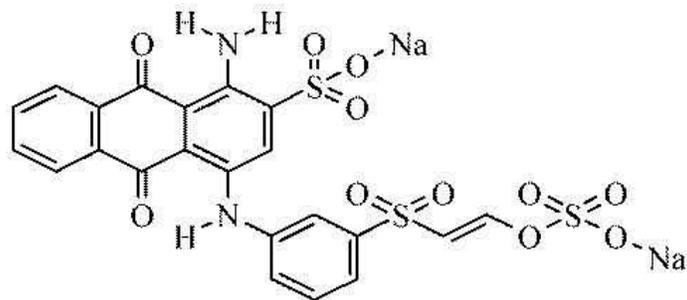


Figura 7. Estructura química del colorante azul brillante de remazol (RBB). (Mafra y Zuim, 2013)

Primeramente se prepara una solución de almidón-azure al 2% disuelto en MOPS 100 mM pH 7.5, el almidón se solubiliza calentando la solución a 70 °C en baño María por 30 min. Después se toma una alícuota de 15 μ L del extracto enzimático, el cual se mezcla con 1 mL de solución de almidón-azure y se incuba a 30 °C. Se tomaron alícuotas de 200 μ L a 0, 5, 10, 20 y 30 min después de iniciada la reacción y la actividad enzimática se inactivó agregando 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Se centrifugó a 4167 \times g durante 10 min y se determinó la absorbancia a 595 nm en el sobrenadante. Las lecturas se graficaron y se obtuvo la pendiente de la parte recta, la cual corresponde a la actividad enzimática expresada como incremento en absorbancia a 595 nm por min (Δ_{595}/min) (Doehlert y Duke, 1983). A la par, se determinó la cantidad de proteína presente en los extractos mezclando 15 μ L de extracto con 200 μ L de reactivo de Bradford y determinando la absorbancia a 595 nm. La cantidad de proteína presente se obtuvo al interpolar las lecturas obtenidas en una curva patrón construida con cantidades conocidas de albúmina sérica bovina. La actividad se expresó como actividad específica y por gramo de peso fresco.

4.3. ZIMOGRAMAS

A partir de las muestras presentadas en la tabla 2 se elaboraron extractos enzimáticos, de los cuales se tomaron alícuotas con 30 μ g de proteína que se mezclaron con un volumen igual de amortiguador de muestra (glicerol 20%, azul de bromofenol 0.004% y Tris-HCl 125 mM (pH 6.8)) y se analizaron en un gel nativo cuya composición se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Composición de geles de poliacrilamida usados para zimogramas de actividad amilolítica.

	Gel Separador (acrilamida al 6%)	Gel Concentrador (acrilamida al 4%)
Acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8%	1.0 mL	0.5 mL
TRIS-HCl 2.5 M pH 8.8	0.45 mL	-
TRIS-HCl 0.5 M pH 6.8	-	0.5 mL
H ₂ O	3.11 mL	1.48 mL
Persulfato de sodio 10%	37.5 μ L	18.75 μ L
TEMED	5.0 μ L	2.5 μ L
Amilopectina de papa 0.15%	0.015 g disueltos en 400 μ L H ₂ O	-

La corrida se hizo a 50 volts por 3 h usando como amortiguador de corrida Tris 25 mM (pH 8.3) y glicina 190 mM. En búsqueda de los mejores resultados se probaron diferentes concentraciones de acrilamida (de 7 a 5%) y de amilopectina de papa (de 0.3 a 0.15%).

4.4. IDENTIFICACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS RESPONSABLES DE LA DEGRADACIÓN DEL ALMIDÓN

El establecimiento de la identidad de las enzimas responsables de la degradación del almidón en los extractos vegetales en estudio se hizo utilizando un kit desarrollado por la empresa Megazyme International, el cual para la detección de α -amilasa (*Ceralpha*), emplea como sustrato el oligosacárido *p*-nitrofenil maltoheptaósido cuyo extremo no reductor está bloqueado por un grupo metil-benzeno como se muestra en la figura 5. El análisis se lleva a cabo en presencia de α -glucosidasa. Inicialmente, se incuban por separado 200 μ L de la solución con el sustrato y 200 μ L del extracto enzimático a 40 °C por 5 min. Pasado ese tiempo, se mezclan ambas soluciones y se incuban por 20 min a 40 °C. La actividad de α -amilasa puede ser evaluada gracias a que después de la hidrólisis del oligosacárido, la α -glucosidasa hidroliza cuantitativamente el fragmento *p*-nitrofenil

maltosacárido a glucosa, liberando el grupo *p*-nitrofenol. En la figura 5 se presenta un esquema que ilustra lo anterior. La reacción se detiene agregando 3 mL de fosfato trisódico, y el *p*-nitrofenol liberado es detectado a 400 nm.

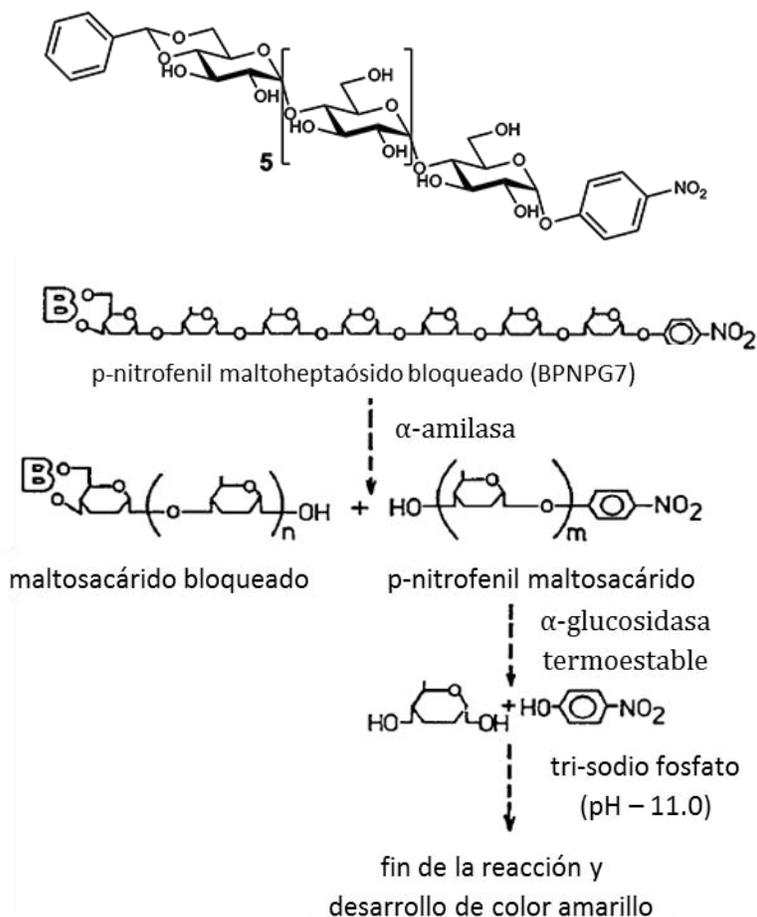


Figura 5. (Arriba) Estructura del sustrato p-nitrofenil maltoheptaósido bloqueado por un grupo metil-benzeno en su extremo no reductor. (Abajo) Base teórica del ensayo de degradación de almidón (*Ceralpha*) para detectar la actividad de α-amilasa.

La detección de actividad de β-amilasa fue realizada siguiendo el método *Betamyl-3*, que emplea β-glucosidasa de alta pureza y *p*-nitrofenil-β-D-maltotriósido como sustrato. Una alícuota de 200 μL de la solución con el sustrato y 200 μL de la solución enzimática se preincubaron a 40 °C por 5 min. Transcurrido ese tiempo, se mezclan ambos volúmenes y se hizo una incubación adicional por 10 min a 40 °C. La reacción se detuvo agregando 3 mL de solución de Trizma base al 1% (m/v) pH 8.5. Al llevarse a cabo la hidrólisis del

sustrato para producir maltosa y p-nitrofenil- β -D-glucosa por acción de la β -amilasa, la β -glucosidasa presente en el ensayo cataliza la hidrólisis del p-nitrofenil- β -D-glucosa a D-glucosa y p-nitrofenol, por lo que la cantidad de p-nitrofenol liberado puede relacionarse directamente con la actividad de β -amilasa. La solución de Trizma base al 1% (m/v) y pH 8.5, permite que el fenolato desarrolle un color cuya absorbancia se lee a 400 nm. En la figura 6 se presenta un esquema que ilustra lo anterior.

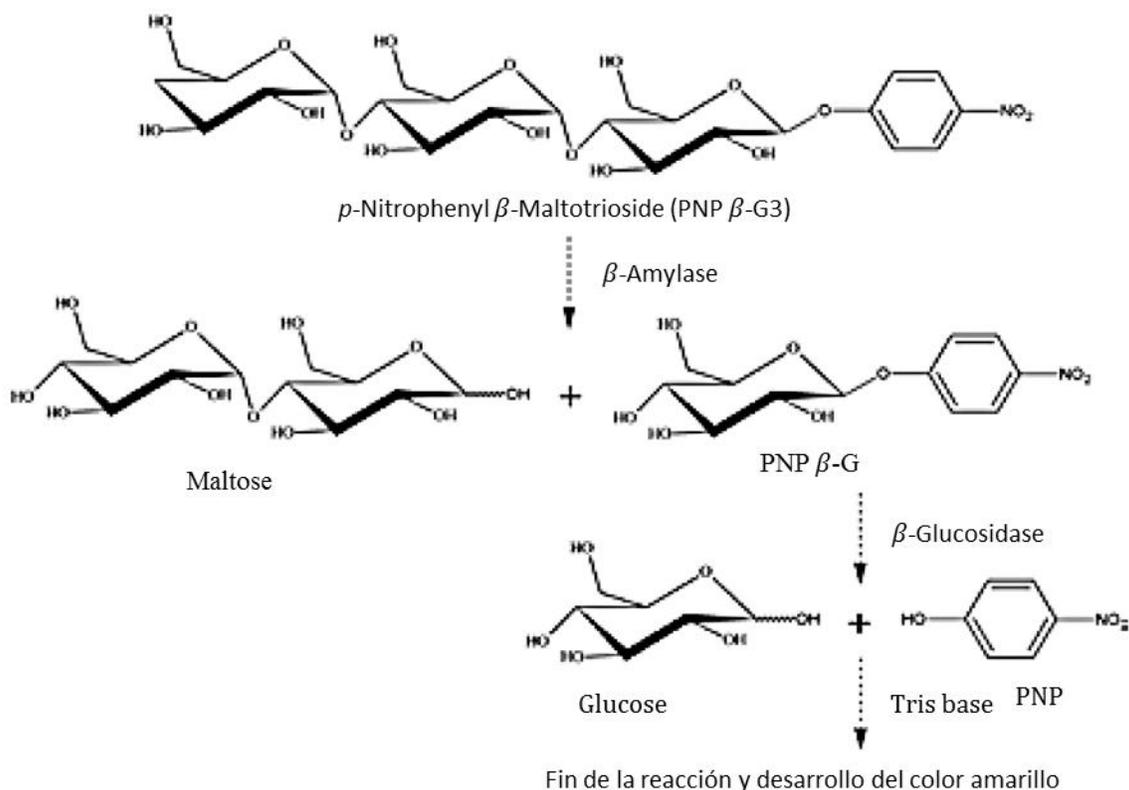


Figura 6. Base teórica del ensayo de degradación de almidón (Betamyl-3) para detectar la actividad de β -amilasa.

4.5. PURIFICACIÓN DE LA α -AMILASA

Para la purificación de la actividad enzimática responsable de la degradación de almidón-azure en extractos de vainas de frijol se usaron varias estrategias. En la primera, se siguió un procedimiento previamente reportado por Chandrashekharaiyah, Krishna, et.al., (2013). De acuerdo con éste, el extracto crudo se calentó a 70 °C por 10 min con el fin de desnaturalizar las proteínas acompañantes. Se midió la actividad en el sobrenadante

después de centrifugar a $13890 \times g$ durante 10 min. Una vez que se corroboró que la actividad enzimática no fue afectada por el tratamiento térmico, alícuotas de 500 μL se precipitaron con cantidades crecientes de sulfato de amonio (20, 30, 40 y 50%). La concentración deseada se alcanzó agregando sulfato de amonio sólido lentamente y en agitación continua. Las mezclas resultantes se mantuvieron a 4°C por 30 min para después ser centrifugadas a $13890 \times g$ por 15 min. Los precipitados fueron resuspendidos en 200 μL de amortiguador de extracción y se determinaron la actividad y cantidad de proteína.

En la segunda metodología, 4.5 mL de extracto enzimático se precipitaron con sulfato de amonio al 30%. Después de centrifugar a $13890 \times g$ por 15 min, al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio hasta alcanzar el 70%. La mezcla se incubó 30 min a 4°C y se centrifugó a $13890 \times g$ por 15 min. El precipitado se resuspendió en 500 μL de amortiguador de extracción y se desaló en una columna de Sephadex G-25 equilibrada en amortiguador de extracción. Se tomaron dos alícuotas de 480 μL para ponerse en contacto con dos resinas de intercambio aniónico, Q-Sepharose (intercambiador aniónico fuerte, con un grupo iónico intercambiable, una amina cuaternaria y tamaño de partícula promedio de 90 μm) y DEAE-Sepharose (intercambiador aniónico débil, con un grupo iónico intercambiable, un dietilaminoetil y tamaño de partícula promedio de 90 μm). La enzima se recuperó lavando con 1 mL de amortiguador de extracción y subsecuentes lavados con 500 μL con concentraciones crecientes de NaCl (100, 200, 300, 500 y 1000 mM) en amortiguador de extracción. Entre las eluciones con las soluciones con NaCl se realizó un lavado con 1 mL de amortiguador de extracción.

La tercera metodología consistió en una cromatografía de afinidad usando amilosa de papa (Beers y Duke, 1990). Para tal efecto, 200 mg de amilosa de papa se resuspendieron en 5 mL de amortiguador A que contiene Hepes-NaOH 40 mM (pH 7.2), NaCl 200 mM, CaCl_2 3 mM y DTT 3 mM y se empacó en una columna pequeña. El extracto enzimático se hizo pasar 3 veces por la columna. Finalizado este proceso, se procedió a lavar la columna con 5 mL de amortiguador A y 16 mL de amortiguador B compuesto por el sistema acetato de sodio-NaOH 10 mM (pH 6.0) y CaCl_2 1 mM. La

enzima fue recuperada haciendo pasar 1.5 mL de dextrina de papa al 1% disuelta en amortiguador B.

La enzima eluida se concentró por ultrafiltración usando una membrana de diálisis cubierta con polietilenglicol hasta obtener un volumen final de 500 μ L.

4.6. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

Las proteínas presentes en los extractos originales y las obtenidas durante el proceso de purificación, se analizaron en geles desnaturalizantes, los cuales se prepararon como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Composición de geles de poliacrilamida usados para electroforesis desnaturalizante.

	Gel Separador (acrilamida al 11%)	Gel Concentrador (acrilamida al 4%)
Acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8%	1.84 mL	0.4 mL
TRIS-HCl 2.5 M pH 8.8	0.62 mL	-
TRIS-HCl 0.5 M pH 6.8	-	0.5 mL
H ₂ O	2.51 mL	1.1 mL
Persulfato de sodio 10%	37.5 μ L	18.75 μ L
TEMED	5.0 μ L	2.5 μ L
SDS 20%	25 μ L	10 μ L

Las muestras se desnaturalizaron agregando un volumen similar de amortiguador de carga consistente en SDS 4%, 2-mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.004% y Tris-HCl 125 mM (pH 6.8). Las mezclas se incubaron por 5 min a 95 °C y posteriormente se centrifugaron a 16000 \times g durante 10 min. Los pozos se cargaron con el volumen correspondiente a 50 μ g de proteína. Como amortiguador de corrida se usó uno compuesto por Tris 25 mM (pH 8.3), glicina 190 mM y SDS 0.1%. Finalmente, se hizo pasar un voltaje de 100 V por un periodo de 1 h. Algunos geles se tiñeron con azul de Coomassie y otros se transfirieron a membranas de PVDF. Las muestras provenientes del

proceso de purificación se precipitaron agregando 3 volúmenes de acetona e incubando por 2 h a -20 °C. Transcurrido este tiempo, la solución se centrifugó a 13890 x g durante 10 min. El precipitado fue resuspendido en 20 µL de amortiguador preparado con el sistema acetato de sodio-NaOH 10 mM (pH 6.0) y CaCl₂ 1 mM. Antes de ser analizadas, las muestras proteicas también se desnaturalizaron.

4.6.1. INMUNOANÁLISIS (WESTERN-BLOT)

Terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF usando amortiguador de transferencia preparado con Tris 25 mM (pH 8.3), glicina 190 mM y metanol 20 %. La transferencia se llevó a cabo a 100 V por 2 h.

La membrana fue incubada por 1 h en amortiguador de bloqueo que contiene leche descremada al 5% disuelta en TBST (Tris 20 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.1%). Se puso en agitación suave a temperatura ambiente por 1 h y posteriormente se agregó el anticuerpo contra α -amilasa, desarrollado en conejo contra enzimas de tubérculo de papa por la compañía Agrisera, y diluido 1:2000. Se incubó durante una noche a temperatura de 4 °C. Al día siguiente, la membrana fue lavada 3 veces por 15 min con amortiguador TBST antes de incubarse en la solución de anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano en una dilución 1:20000, desarrollado por la empresa Santa Cruz. Después de 1 h de agitación suave a temperatura ambiente, la membrana fue lavada 3 veces por 15 min con amortiguador TBST antes de ser revelada por quimioluminiscencia. En otro ensayo, se prepararon dos membranas para ser usadas con los extractos obtenidos de la purificación parcial de la enzima, una fue tratada con anticuerpos específicos contra α -amilasa y una segunda con anticuerpos específicos contra β -amilasa desarrollado en conejo contra enzimas de tubérculo de papa por la compañía Agrisera en una dilución 1:2000.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA

En la figura 8 se presentan los resultados de la degradación de almidón-azure por los extractos de vaina del genotipo C60, mientras que en las figuras 9 y 10, se muestran los obtenidos con los genotipos G26 y G15, respectivamente. Se aprecia que en condiciones normales, en el periodo de 20 a 25 días posteriores a la floración, la actividad de las enzimas que degradan almidón-azure es baja. La actividad amilolítica fue indetectable en los otros 2, la actividad se incrementó ligeramente conforme avanzó el periodo de maduración de las semillas. En todos los casos, la remoción de los frutos incrementa de manera notable la actividad enzimática responsable de la degradación de almidón-azure. Sin embargo, el incremento es particularmente notable en los extractos del genotipo G26 (Figura 9).

Los frutos removidos de la planta se incubaron en oscuridad a temperatura y humedad relativa ambientales. Bajo esas condiciones, la pérdida de agua puede ser importante. Para descartar que los incrementos que muestra la actividad de hidrólisis de almidón-azure fueran debidos a la pérdida de agua de los tejidos analizados, la actividad amilolítica se expresó tanto por gramo de peso fresco, como en función de la cantidad de proteína presente en los extractos analizados (actividad específica). En ambos casos los resultados son similares. Esto sugiere que en respuesta a la falta de nutrimentos se estimula la actividad de enzimas capaces de degradar el almidón presente en el tejido de la vaina, como una alternativa para generar azúcares que sean usados en la formación de las semillas.

Las plantas exhiben numerosos mecanismos de adaptación a la deficiencia de nutrimentos. Se ha reportado que la falta de nutrimentos como el nitrógeno, fósforo y potasio estimulan la expresión de amilasas, especialmente de β -amilasa (Theodorou y Plaxton, 1993; Osaki, Ueda, et.al., 1995).

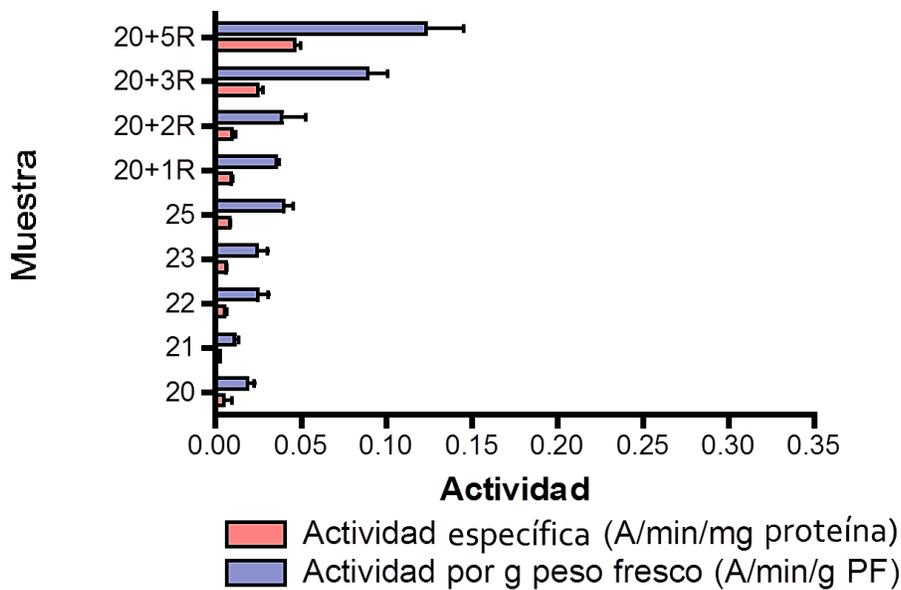


Figura 8. Actividad amilolítica específica y por gramo de peso fresco en vainas de frutos del genotipo C60 de frijol en el periodo de 20 a 25 días posteriores a la floración y en frutos que fueron removidos 20 días después de la floración (R) y analizados posteriormente. La letra R precedida por un número indica que la muestra fue removida de la planta e incubada en oscuridad por dicho número de días antes de su almacenamiento a -70°C .

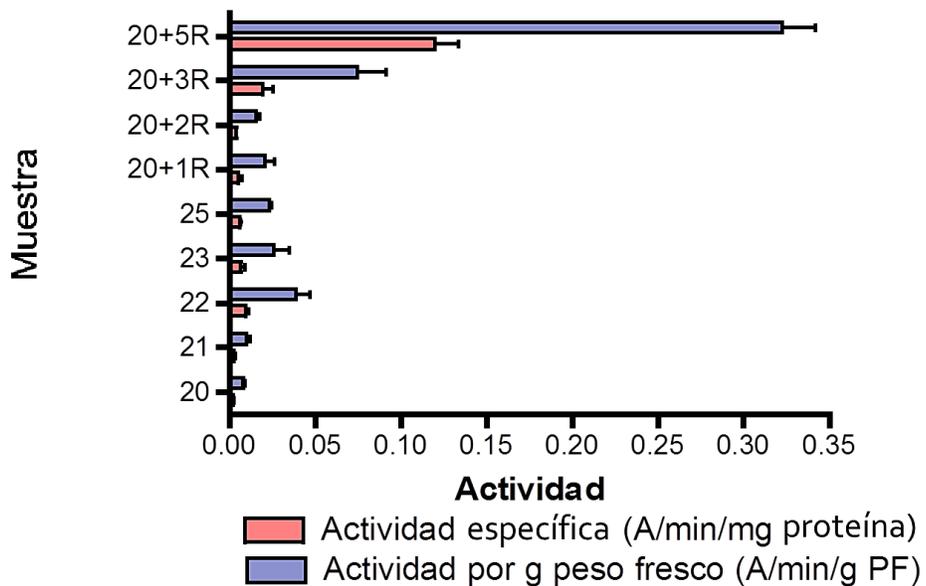


Figura 9. Actividad amilolítica específica y por gramo de peso fresco en vainas de frutos del genotipo G26 de frijol en el periodo de 20 a 25 días posteriores a la floración y en frutos

que fueron removidos 20 días después de la floración (R) y analizados posteriormente. La letra R precedida por un número indica que la muestra fue removida de la planta e incubada en obscuridad por dicho número de días antes de su almacenamiento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

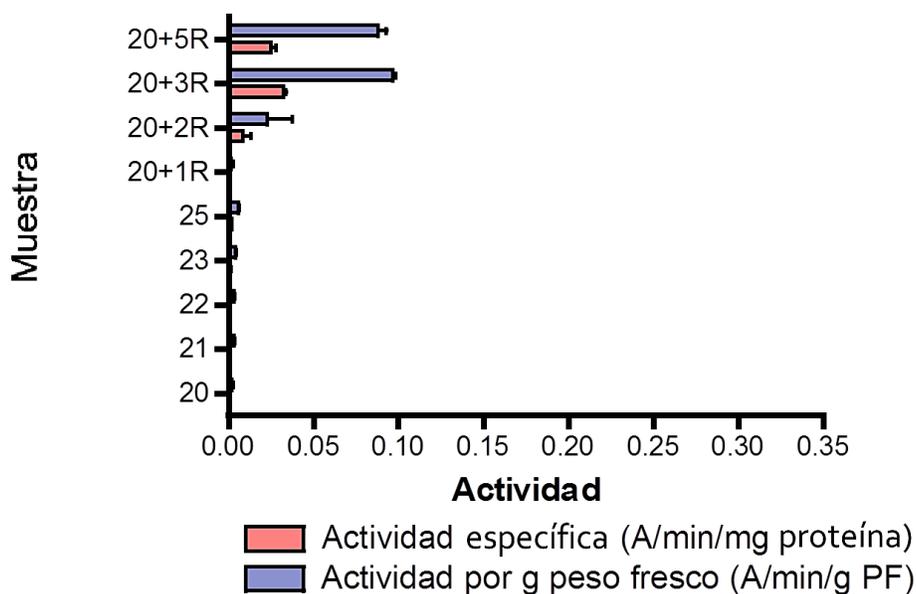


Figura 10. Actividad amilolítica específica y por gramo de peso fresco en vainas de frutos del genotipo G15 de frijol en el periodo de 20 a 25 días posteriores a la floración y en frutos que fueron removidos 20 días después de la floración (R) y analizados posteriormente. La letra R precedida por un número indica que la muestra fue removida de la planta e incubada en obscuridad por dicho número de días antes de su almacenamiento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Con la finalidad de obtener mayor información acerca de las características de las enzimas con actividad amilolítica presentes en los extractos de las vainas de frijol, se hicieron gels en donde las proteínas se revelaron por su capacidad para degradar amilopectina. La figura 11 muestra un gel en donde se analiza el genotipo Canario-60 después de ser teñido con lugol. En la parte superior de la misma aparecen unas bandas cuya intensidad muestra un incremento ligero en frutos que se desarrollan en condiciones normales durante el periodo de 20 a 25 días después de la floración. En los frutos removidos el incremento es mucho mayor. En la parte inferior del gel se aprecian algunas bandas cuya contribución parece menor. Sin embargo, llama la atención que en los frutos removidos, 1 día después de que fueron separados de la planta aparecen 2 bandas de peso

molecular bajo, cuya contribución parece importante. En términos generales existe una buena correlación entre los resultados de la actividad amilolítica medida con almidón-azure (Figura 8) y los obtenidos al usar el zimograma (Figura 11). Sin embargo, aunque se ensayaron diferentes concentraciones de poliacrilamida y amilopectina de papa, no se logró una buena separación de las enzimas con actividad amilolítica, pues para todas las muestras, las enzimas quedaban retenidas en la parte superior del gel.

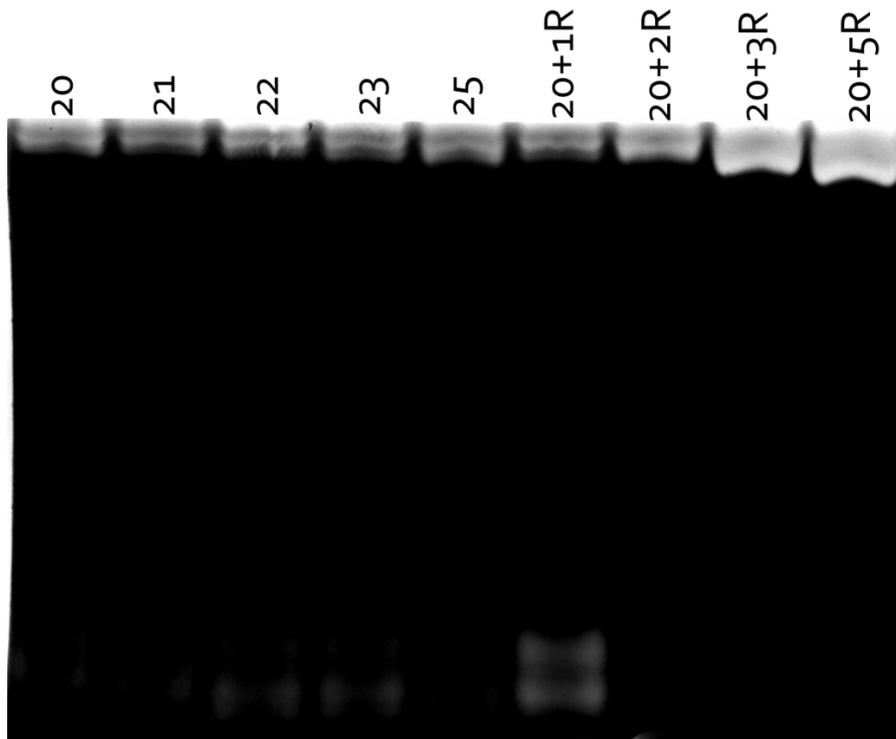


Figura 11. Zimograma de enzimas con actividad amilolítica en extractos de vaina de frutos de frijol del genotipo C60 usando como sustrato amilopectina de papa. Se observa que a medida que el tiempo de remoción del fruto se incrementa, también lo hace la actividad amilolítica, siendo el incremento más notorio en las muestras cortadas e incubadas antes de ser preservadas en congelación. La letra R precedida por un número indica que la muestra fue removida de la planta e incubada en obscuridad por dicho número de días antes de su almacenamiento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2. IDENTIDAD DE LAS ENZIMAS RESPONSABLES DE LA DEGRADACIÓN DE ALMIDÓN EN LAS VAINAS DE LOS FRUTOS DE FRIJOL

El uso de la metodología propuesta por Megazyme International para la identificación de las enzimas responsables de la degradación del almidón en los extractos de las vainas de los frutos de frijol indica que este proceso se lleva a cabo con la participación de α y β -amilasas (figuras 12 y 13, respectivamente).

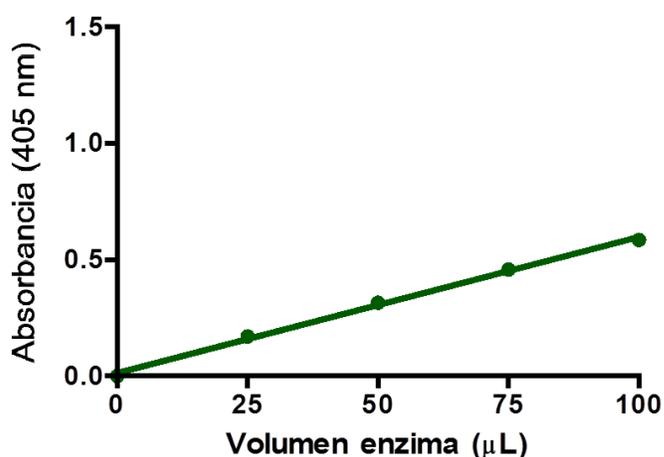


Figura 12. Absorbancia debida a la actividad de α -amilasa en el extracto original del genotipo G26 muestra 20+5 R. La actividad fue evidenciada utilizando el kit desarrollado por Megazyme International para la detección de α -amilasa.

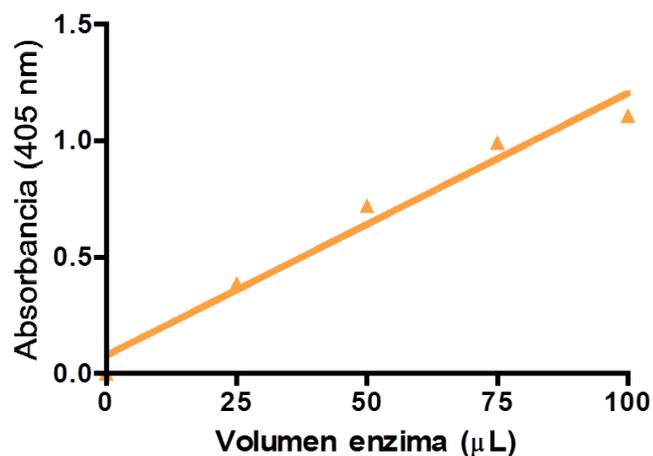


Figura 13. Absorbancia debida a la actividad de β -amilasa en el extracto original del genotipo G26 muestra 20+5 R. La actividad fue evidenciada utilizando el kit desarrollado por Megazyme International para la detección de β -amilasa.

5.3. PURIFICACIÓN PARCIAL DE ENZIMAS AMIOLÓTICAS

En la figura 14 se observan las lecturas correspondientes a la actividad amilolítica específica usando almidón-azure como sustrato durante el proceso de purificación por medio de la precipitación con sulfato de amonio del extracto del genotipo G26 muestra 20+5 R. Se aprecia que el tratamiento térmico (E 2) no tiene un impacto negativo sobre la capacidad de las enzimas capaces de degradar almidón-azure. La mayor parte de la actividad presente en el extracto calentado puede ser precipitada con sulfato de amonio a una concentración del 40% de saturación (E 40).

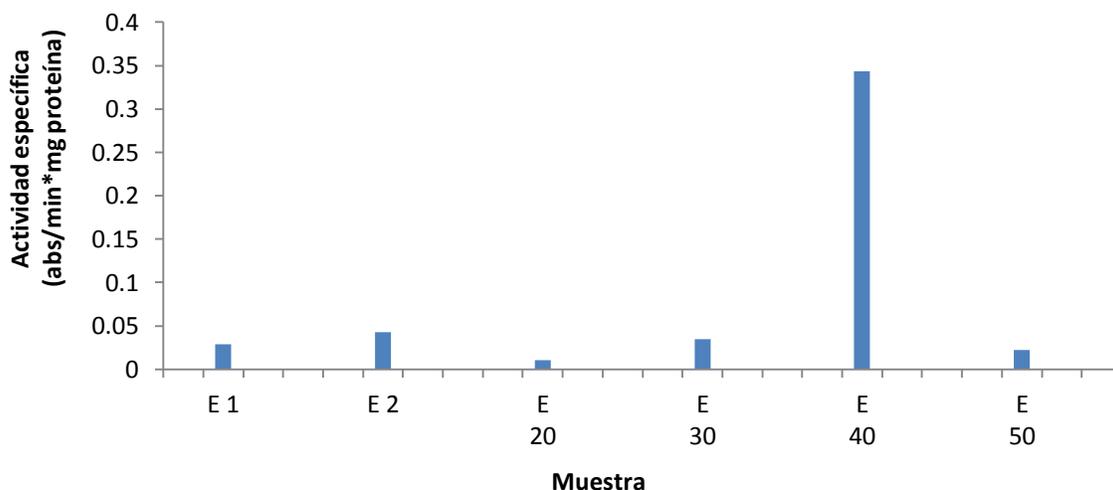


Figura 14. Actividad amilolítica específica de los extractos del genotipo G26 muestra 20+5 R, original (E 1) y con tratamiento térmico (E 2). Este último fue posteriormente precipitado con diferentes concentraciones de sulfato de amonio (E 20, E 30, E 40, E 50).

En un segundo intento de purificación, se empleó extracto original del genotipo G26 muestra 20+5 R para ensayar con la cromatografía de intercambio aniónico empleando las resinas Q-Sepharose y DEAE-Sepharose, sin embargo, las enzimas responsables de la degradación de almidón-azure no se unieron a ninguna de las dos resinas de intercambio

aniónico empleadas (datos no mostrados), por lo que fue necesario usar una alternativa diferente.

El uso de la cromatografía de afinidad descrita por Beers y Duke (1990) empleando una columna de amilosa de papa mostró mejores resultados en cuanto a pasos de purificación, tratamiento de residuos, tiempo y recuperación de enzima pura. La cromatografía se llevó a cabo empleando extracto original del genotipo G26 muestra 20+5 R, una vez eluida, la enzima se concentró empleando una membrana de diálisis cubierta con polietilenglicol antes de ser conservada para posteriores análisis. En la figura 15 se observa la actividad específica correspondiente a los extractos obtenidos durante el proceso de purificación y concentración; en la tabla 5 se muestra el avance de la purificación así como su rendimiento.

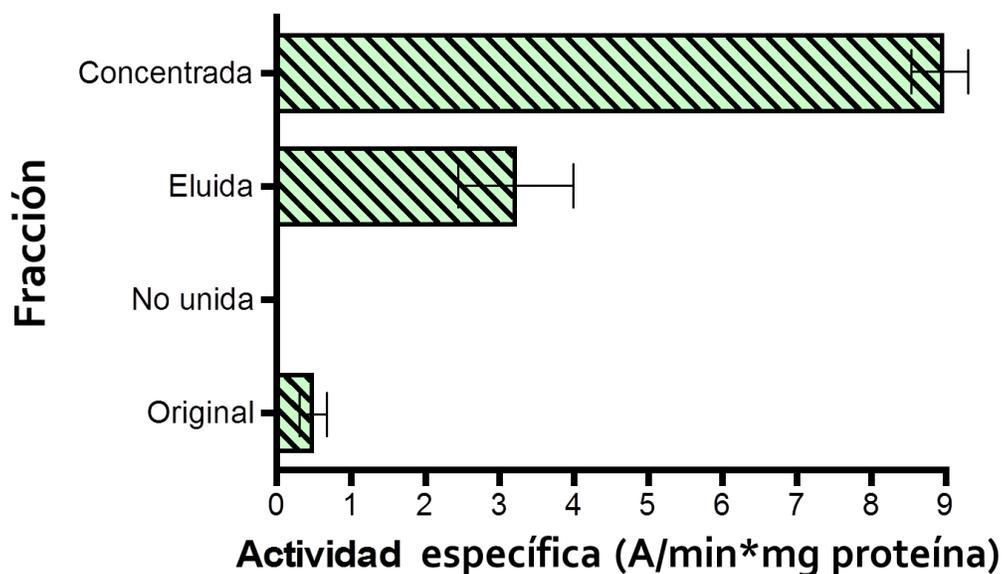


Figura 15. Actividad amilolítica específica durante la purificación por afinidad de enzimas capaces de degradar almidón-azure presentes en extractos de vaina de frijol del genotipo G26 muestra 20 + 5R.

Tabla 5. Seguimiento de la purificación de α -amilasas en el extracto del genotipo G26 muestra 20+5R.

Paso purificación	Volumen (μL)	Actividad total (Δ_{595}/min)	Proteína total (mg)	Actividad específica ($\Delta_{595}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína)	Rendimiento	Purificación n-fold
Extracto original	9000	6.33×10^{-3}	8.135	0.467	100	1.0
Fracción eluida	10000	0.47×10^{-3}	0.048	3.196	7.36	6.84

Para establecer la identidad de la enzima purificada, se usó el kit de Megazyme International para α y β -amilasa. Los resultados para α -amilasa se muestran en la figura 16.

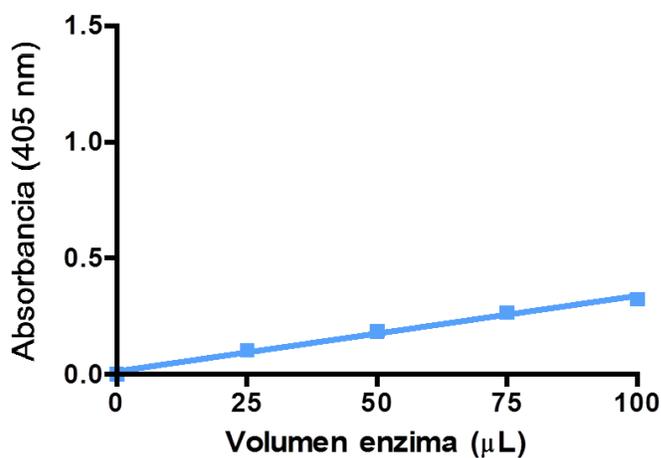


Figura 16. Absorbancia debida a la actividad de α -amilasa en la fracción concentrada obtenida de la cromatografía de afinidad.

En el ensayo para la detección de β -amilasa, no se obtuvo una respuesta detectable por medio de la absorbancia a 405 nm para ningún volumen de enzima. Al comparar estos resultados con los obtenidos al analizar el extracto crudo (las figuras 12 y 13), se observa que en el extracto original, la actividad amilolítica corresponde a una mezcla de α y β -amilasa; mientras que en la fracción purificada solo se detecta α -amilasa. Esto comprueba

que la purificación por medio de la cromatografía de afinidad es un método efectivo para separar a la α -amilasa de otras enzimas amilolíticas.

Para comprobar la eficiencia del proceso de purificación, se hizo un análisis electroforético de las diferentes fracciones (figura 17). Como puede apreciarse, después de concentrar las proteínas presentes en la fracción eluida de la columna de afinidad, se observan tres bandas de 46, 54 y 62 kDa.

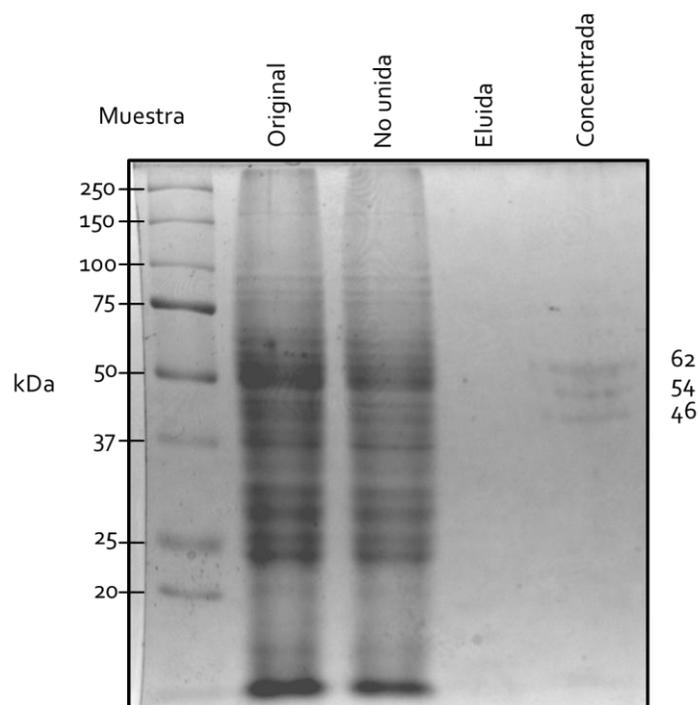


Figura 17. Gel de electroforesis desnaturalizante correspondiente a las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación del extracto obtenido del genotipo G26 muestra 20+5 R.

Utilizando una técnica similar, Beers y Duke (1990) purificaron a partir de brotes y cotiledones de chícharo una α -amilasa de 46 kDa. Con el fin de establecer la identidad de las bandas obtenidas, se llevó a cabo el análisis Western-blot utilizando anticuerpos contra α y β -amilasa (Figura 18).

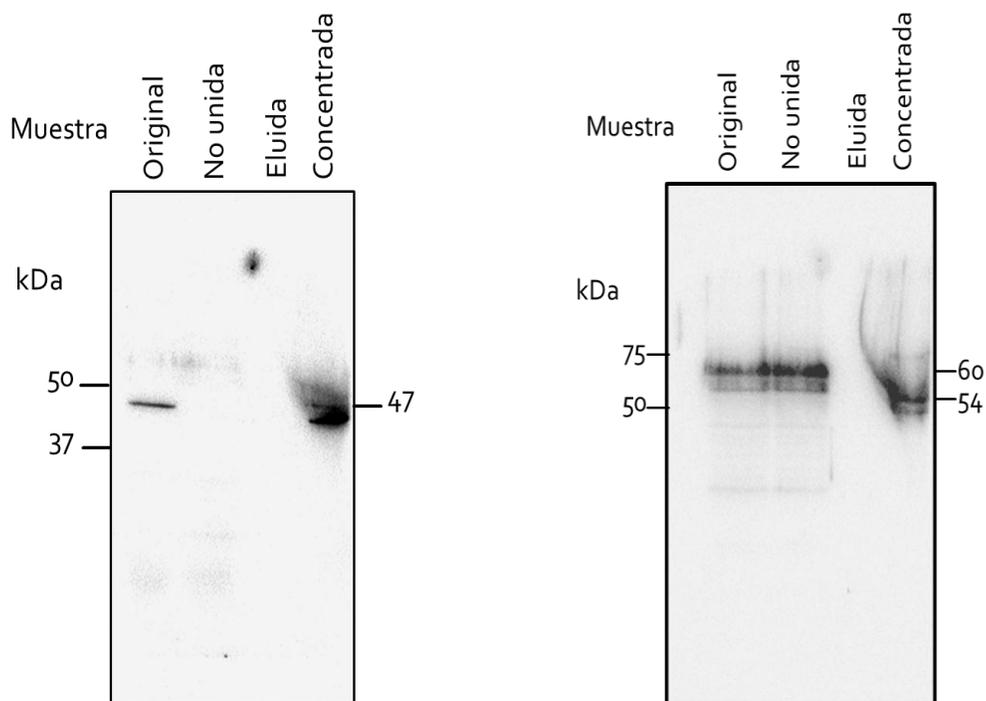


Figura 18. Análisis de las proteínas presentes en las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de α -amilasa proveniente del extracto del genotipo de frijol G26 muestra 20+5 R. Izquierda: membrana tratada con anticuerpos anti- α -amilasa. Derecha: membrana tratada con anticuerpos anti- β -amilasa.

Los resultados de este análisis muestran que en el extracto original el anticuerpo contra α -amilasa detecta una banda de 47 kDa. Este tamaño es muy similar al que ha sido reportado por Bedón, Nolasco, et.al., (2013), Beers y Duke (1990), Chavan y Wadatkar (2014) y Tripathi, Leggio, et.al., (2007) cuando analizaron α -amilasas purificadas de *Chenopodium quinoa*, *Pisum sativum* L., *Phaseolus aconitifolius* y *Vigna radiata* respectivamente, lo que lleva a suponer que de las tres bandas observadas en la figura 17, solo la correspondiente a 46 kDa pertenece a α -amilasa. Por su parte, el anticuerpo contra β -amilasa reconoce a una de 60 kDa en el extracto original y la fracción no unida. El proceso de purificación es muy efectivo para lograr la separación de ambas: mientras que la β -amilasa no se une a la matriz de afinidad, la α -amilasa se une muy eficientemente. Cabe mencionar que en la fracción purificada el anticuerpo contra β -amilasa parece reconocer una banda de 54 kDa, que no se aprecia en las fracciones anteriores, lo que lleva a pensar

que se trata de un contaminante, o bien un producto de degradación reconocido de manera no específica por los anticuerpos contra β -amilasa.

Se ha reportado que la actividad de α -amilasa se estimula en respuesta a condiciones de estrés. Con el fin de investigar si el estrés generado por la falta de nutrimentos provenientes de la planta estimula la expresión de esta proteína, se usaron anticuerpos específicos para evaluar por Western-blot los cambios en la cantidad de enzima en respuesta al desarrollo y a la falta de nutrimentos. Las figuras 19, 20 y 21 muestran los resultados correspondientes a los genotipos C60, G26 y G15, respectivamente. Los geles teñidos con azul de Coomassie muestran que la cantidad de proteína es muy similar para todas las muestras.

La membrana correspondiente a las muestras del genotipo C60 (Figura 19) muestra que el anticuerpo reconoce dos bandas. Una correspondiente a 75 kDa que se vuelve más notoria en los extractos elaborados con los frutos que se removieron de la planta 3 y 5 días antes de ser analizados (R). La otra banda es de 46 kDa que es visible únicamente en las muestras 20 + 3R y 20 + 5R, lo que podría indicar que la síntesis de esta enzima podría ser una respuesta a la falta de los nutrimentos provenientes de la planta.

En la membrana correspondiente a las muestras del genotipo G26 (Figura 20), también se observan dos bandas de 75 kDa y 47 kDa, que a diferencia del genotipo C60, son visibles en todos los extractos. Sin embargo, la banda de 75 kDa muestra un incremento muy importante en la muestra 20 + 5R, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la lectura de actividad amilolítica (Figura 9).

En las muestras del genotipo G15 (Figura 21) el anticuerpo contra α -amilasa también reconoció 2 bandas, una de 46 kDa presente en todas las muestras y cuya concentración permanece constante, y otra de 67 kDa que aparece en los extractos 20+2R, 20+3R y 20+5R, lo que podría indicar que también constituyen una respuesta a la falta de nutrimentos.

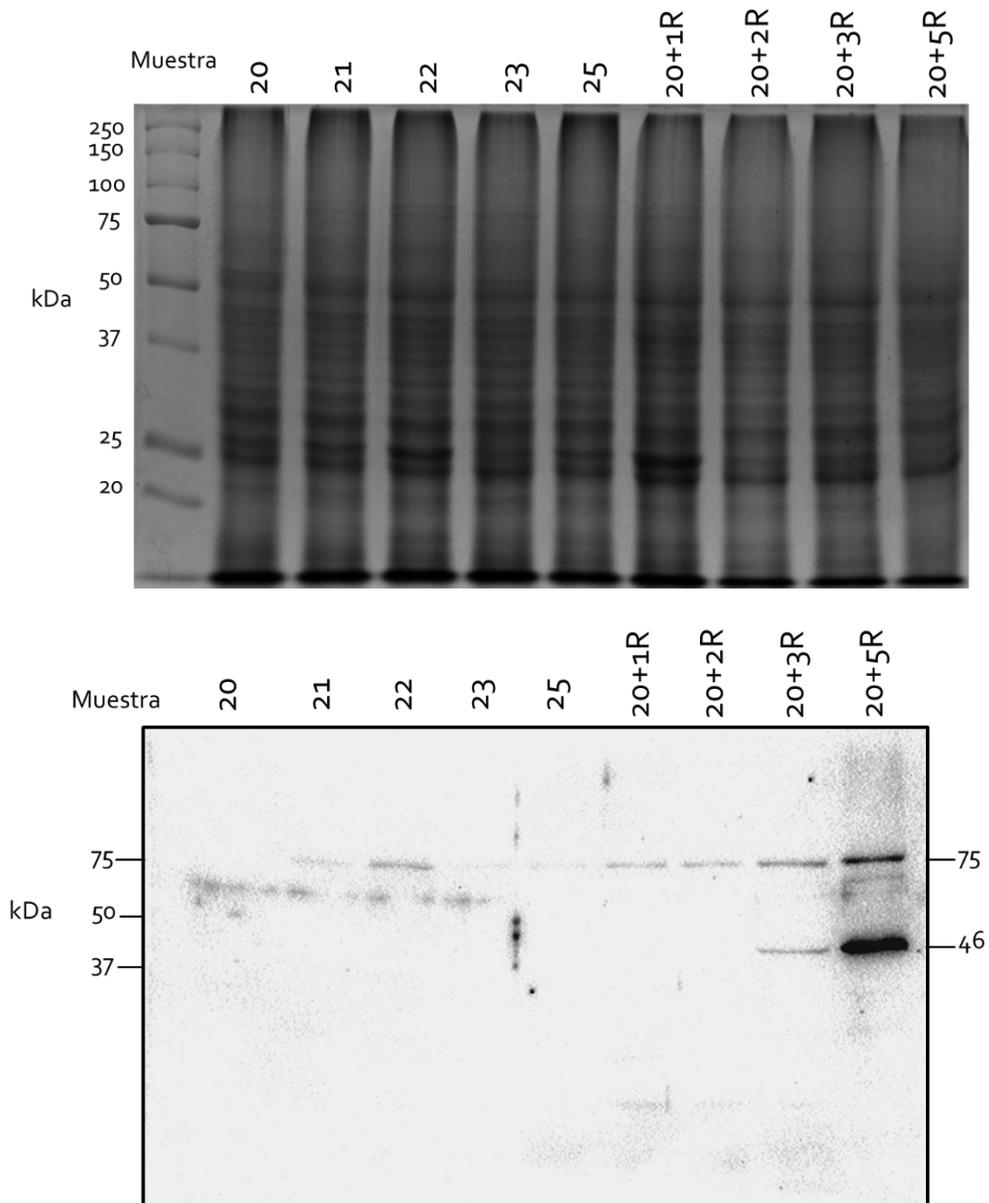


Figura 19. Análisis electroforético de las proteínas presentes en extractos de vaina del genotipo Canario-60 de frijol. (Arriba) Gel de electroforesis desnaturalizante teñido con azul de Coomassie. (Abajo) Membrana a la que fueron transferidas las proteínas separadas por la electroforesis desnaturalizante y posteriormente tratada con anticuerpos anti- α -amilasa.

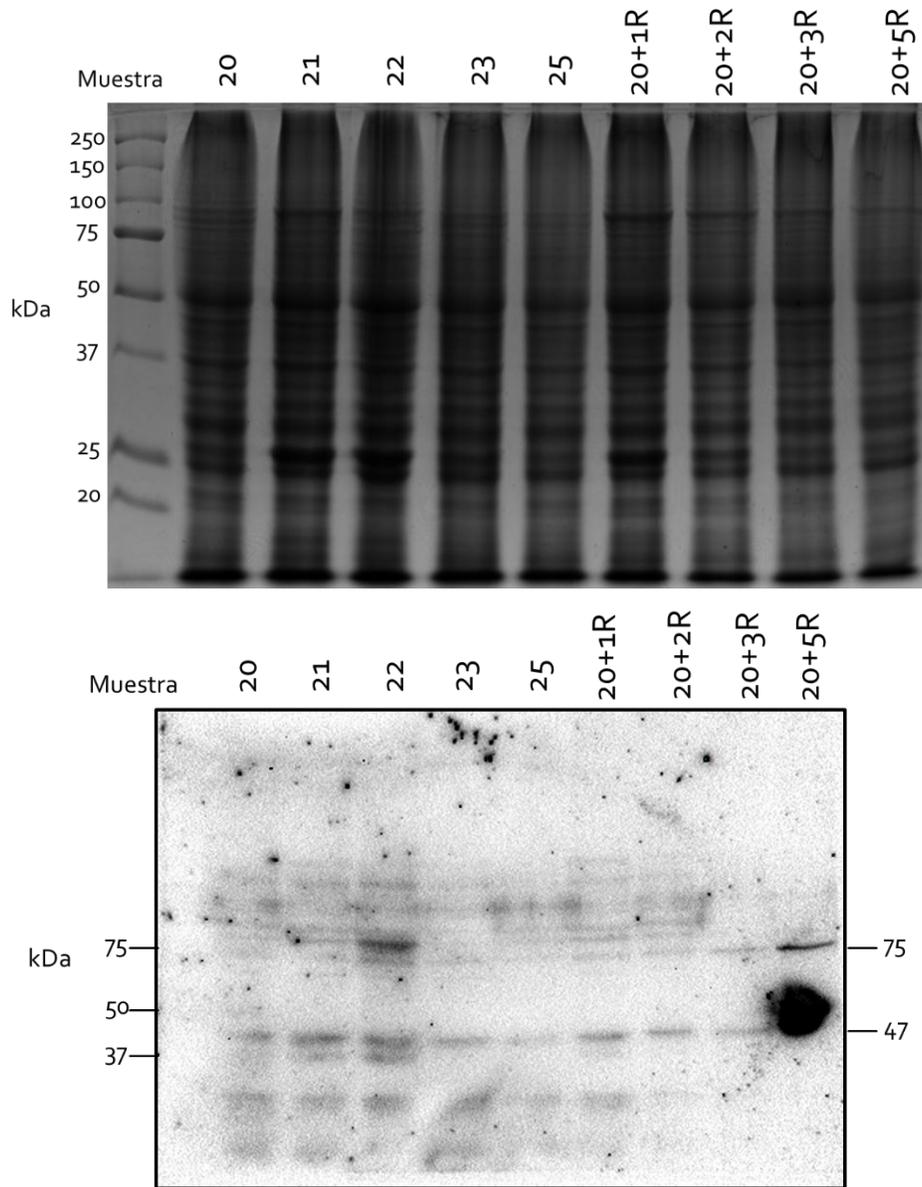


Figura 20. Análisis electroforético de las proteínas presentes en los extractos de vaina del genotipo G26 de frijol. (Arriba) Gel de electroforesis desnaturizante teñido con azul de Coomassie. (Abajo) Membrana a la que fueron transferidas las proteínas separadas por electroforesis desnaturizante y posteriormente tratada con anticuerpos anti- α -amilasa.

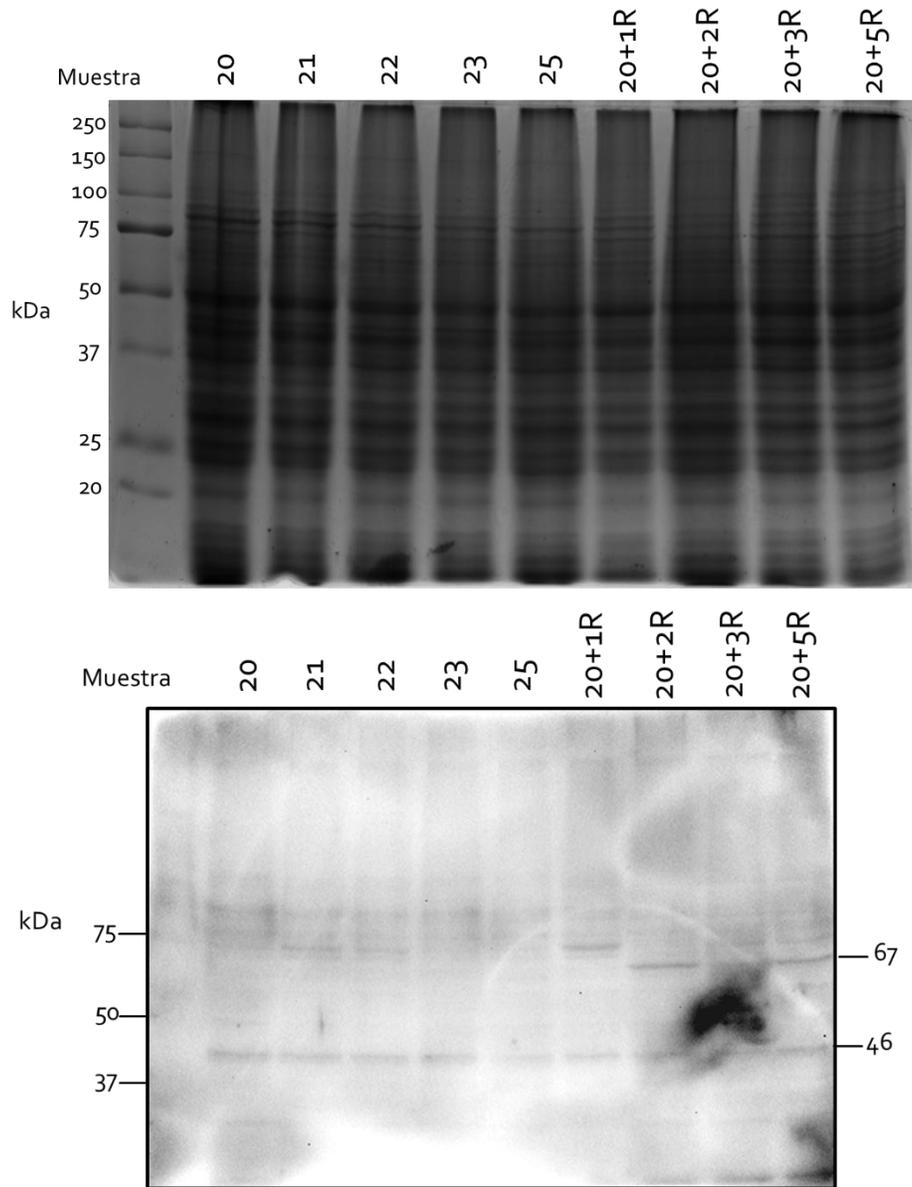


Figura 21. Análisis electroforético de las proteínas presentes en los extractos de vaina del genotipo G15 de frijol. (Arriba) Gel de electroforesis desnaturizante teñido con azul de Coomassie. (Abajo) Membrana a la que fueron transferidas las proteínas separadas en la electroforesis desnaturizante y posteriormente tratada con anticuerpos anti- α -amilasa.

Los resultados obtenidos en este análisis concuerdan con los reportados para diferentes leguminosas como se muestra en la Tabla 1, ya que los investigadores citados encontraron α -amilasa de pesos moleculares alrededor de 46 kDa y algunos alrededor de 75 kDa. Sin embargo, los nuestros también muestran diferencias muy importantes entre los genotipos analizados. Por otro lado, la ausencia de banda de 75 kDa en la enzima purificada (Figura 18) puede atribuirse a que la purificación se hizo usando vainas del genotipo 26, el cual de acuerdo con el ensayo de hidrólisis de almidón-azure tiene la actividad más alta (Figura 9). Como puede apreciarse en la Figura 20, en el genotipo 26 la banda de 75 kDa no es muy abundante. Sin embargo, también es posible que la banda de 75 kDa sea una isoenzima cuya unión con la amilosa no sea muy estable y por lo mismo, la purificación no haya sido muy eficiente.

Por otro lado, el análisis de la actividad amilolítica con almidón-azure muestra que en las vainas de los 3 genotipos hay un aumento muy importante en la actividad de enzimas capaces de degradar almidón (Figuras 8, 9 y 10). Siendo en los extractos del genotipo 26 en donde se observó el mayor incremento. Sin embargo, la actividad no corresponde con la cantidad de proteína detectada con el anticuerpo contra α -amilasa. Una posibilidad es que buena parte de la capacidad de los extractos para degradar almidón-azure sea debida a la participación de β -amilasa, cuyos niveles no fue posible evaluar. Por otro lado, la comparación de nuestros resultados con los obtenidos por González-Castro (2015), muestran que tampoco hay correspondencia entre la actividad amilolítica medida por la hidrólisis de almidón-azure (Figuras 8, 9 y 10), la abundancia de α -amilasa detectada por Western-blot (Figuras 19, 20 y 21) y la degradación del almidón de las vainas cuando los frutos son removidos (Figura 3). El hecho de que el genotipo canario-60 sea el más eficiente para degradar el almidón acumulado sugiere que las enzimas involucradas en el proceso podrían tener diferencias muy importantes en sus propiedades.

6.- CONCLUSIONES

Las vainas de *Phaseolus vulgaris* presentan un incremento de la actividad amilolítica en respuesta al estrés nutricional ocasionado al ser removidas de la planta. En algunos casos el incremento en la actividad amilolítica coincide con una mayor cantidad de α -amilasa detectada por Western-blot.

Las enzimas amilolíticas presentes en la vaina (α -amilasa) en el extracto crudo son estables a la incubación a 70 °C por 10 min, y se les puede precipitar con concentraciones de sulfato de amonio superiores al 40% de saturación.

Las enzimas responsables de la degradación de almidón-azure no se unieron a las resinas de intercambio aniónico probadas (Q-Sepharose y DEAE-Sepharose), pero se les puede purificar eficientemente por cromatografía de afinidad usando una matriz de amilosa de papa.

El análisis de la actividad amilolítica por medio del kit producido por Megazyme muestra que la actividad observada en los extractos crudos es producto de la presencia de α -amilasa y β -amilasa.

Los anticuerpos contra α -amilasa permitieron detectar 2 bandas de aproximadamente 46 y 75 kDa. Estos tamaños corresponden con los resultados reportados por otros autores. Casi invariablemente la abundancia de las mismas se incrementa como consecuencia de la reducción en el suministro de nutrimentos. Sin embargo, hay diferencias muy notables en la respuesta de los diferentes genotipos.

De los tres genotipos analizados, el identificado como G26 es el que presenta el mayor aumento de la actividad amilolítica. Sin embargo, no parece haber una buena correlación entre la actividad amilolítica medida con almidón-azure y la eficiencia con la que se da la removilización del almidón. Esto sugiere que dependiendo del genotipo, las enzimas amilolíticas inducidas pudieran tener diferencias que las hicieran más o menos eficientes.

7.- BIBLIOGRAFÍA:

- Anthea, M., Hopkins, J., McLaughlin, C., Jhonson, S., Warner, M., LaHart, D., Wright, J. 1993. *Human Biology and Health*. Nueva Jersey: Prentice Hall.
- Bedón-Gómez, M., Nolasco-Cárdenas, O., Santa Cruz-Carpio, C., Gutiérrez-Román, A., 2013. *Purificación parcial y caracterización de Alfa Amilasa de granos germinados de Chenopodium quinoa (Quinoa)*. Revista de Ciencia y Tecnología ECIPerú. 10, 51-57.
- Beers, E., Duke, S., 1990. *Characterization of α -Amylase from shoots and cotyledons of pea (Pisum sativum L.) seedlings*. Plant Physiology. 92, 1154-1163.
- Chandrashekharaiyah, K., Kirshna, V., Preethi, Shalini, Narayanaswamy, M., Siddalinga-Murthy, K., Ramachandra-Swamy, N., 2013. *Characterization of Alpha-amylase from the seeds of Mucuna pruriens*. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. 1, 367-374.
- Chavan, S., Wadatkar, C., 2014. *Isolation, purification and characterization of Alpha amylase from Phaseolus aconitifolius*. Journal of Advanced Drug Delivery. 1, 114-121.
- Coello, P. and Martínez-Barajas, E. 2014. *The activity of SnRK1 is increased in Phaseolus vulgaris seeds in response to a reduced nutrient supply*. Frontier in Plant Science. doi: 10.3389/fpls.2014.00196
- Doehlert, D., Duke, S., 1983. *Specific determination of alpha-amylase activity in crude plant extracts containing beta-amylase*. Plant Physiology. 71, 229-234.
- Gómez, M. *¿Qué es el almidón?* [En línea] (Actualizado en abril 2003). Disponible en: <http://rincondelaciencia.educa.madrid.org/Curiosid/Rc-58.html> [Último acceso el 9 de mayo de 2016]

- González-Castro, Y. 2015. *Removilización de nutrientes bajo condiciones ambientales adversas*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Jones J.B. 1982. *Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies*. Journal of Plant Nutrition. 5, 1003-1030.
- Koolman, J., Heinrich, K., 2004. *Bioquímica: Texto y Atlas*. 3° edición. Madrid: Médica Panamericana.
- Ligarreto, G., 2013. *Componentes de variancia en variables de crecimiento y fotosíntesis en frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*. Revista UDCA. Actualidad y divulgación científica. 16, 87-96.
- López, M., 2004. *Tecnologías de producción del cultivo de frijol*. Estado de México: ICAMEX.
- Mafra, M., Zuim, D. *Adsorption of Remazol Brilliant Blue on an orange peel adsorbent*. [En línea] (Actualizado en 2013).
Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322013000300022 [Último acceso el 9 de mayo de 2016]
- Mohamed, S., Almulaiky, Y., Ahmed, Y., Al-Bar, O., Ibrahim, I., 2014. *Purification and characterization of α -Amylase from Miswak *Salvadora persica**. BMC Complementary & Alternative Medicine. 14, 119-129.
- Pessarakli, M., 2001. Induction of proteins in response to biotic and abiotic stresses **En:** Timothy, S., Pessarakli, M. *Handbook of plant and crop physiology*. Florida. Taylor and Francis Group, 657-680
- Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G., Levine, M., 1996. *Structure of human salivary α -amylase at 1.6 Å resolution: implication for its role in the oral cavity*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 52, 435-446.

- SHCP, FND, *Panorama de Frijol*. [En línea] (Actualizado en 2014).
Disponible en:
<http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Frijol%20%28may%202014%29.pdf> [Último acceso el 9 de mayo de 2016]

- SIAP, SAGARPA, *Situación actual y perspectiva de la producción de Frijol en México 2000-2005*. [En línea] (Actualizado en 2005).
Disponible en: <http://www.frijol.gob.mx/index.php?portal=frijol> [Último acceso el 9 de mayo de 2016]

- Theodorou, M., Plaxton, W., 1993. *Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation*. *Plant Physiology*. 101, 339-344.

- Treviño, C., Rosas, R., 2013. *El frijol común: factores que merman su producción*. [En línea] (Actualizado en 2013).
Disponible en: <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol26num1/articulos/el-frijol.html> [Último acceso el 9 de mayo de 2016].

- Tripathi, P., Leggio, L., Mansfeld, J., Ulbrich-Hofmann, R., Kayastha, A., 2007. *A-Amylase from mung beans (*Vigna radiata*) – Correlation of biochemical properties and tertiary structure by homology modelling*. *Phytochemistry*. 68, 1623-1631.

- Osaki, M., Ueda, H., Shinano, T., Matsui, H., Tadano, T., 1995. *Accumulation of carbon and nitrogen compounds in sweet potato plants grown under deficiency of N, P or K nutrients*. *Soil Science and Plant Nutrition*. 41, 557-566.

- Virgilio González, M., 2003. *Cultivo del ejote*. San Salvador: CENTA.

- Walbot, V., Clutter, M., 1972. *Reproductive development and embryogeny in *Phaseolus**. *Phytomorphology*. 22, 59-68.