



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUIMICA

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUIMICAS

**Caracterización bioquímica y funcional
de proteínas de un aislado de ajonjolí
(*Sesamum indicum*) con propiedades
emulsificantes de interés en alimentos**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)
P R E S E N T A :
CARLOS ENRIQUE CORNEJO JUAREZ

Asesor: Amelia Farrés González-Saravia

MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

00551

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS
FACULTAD DE QUIMICA**

**Caracterización bioquímica y funcional de proteínas de un
aislado de ajonjolí (*Sesamum indicum*) con propiedades
emulsificantes de interés en alimentos**

TESIS

que para obtener el grado de Maestro en Ciencias presenta

Carlos Enrique  **Cornejo Juárez**

México D.F. 2002

Lab. 312. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 2002

Tutor: Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Comité Tutorial:

Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Dr. Javier Plasencia de la Parra

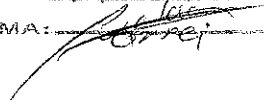
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico y gratis el contenido de mi trabajo receptoral

NOMBRE: Carlos Enrique

Cornejo Juárez

FECHA: 19/11/02

FIRMA: 

1.0 Índice.-

1.0	INDICE.	3
2.0	RESUMEN.	5
3.0	JUSTIFICACIÓN.	7
4.0	INTRODUCCIÓN.	9
4.1	Generalidades.	9
4.2	Aislados proteínicos.	11
4.3	Propiedades funcionales de las proteínas.	13
4.3.1	Solubilidad.	14
4.3.2	Absorción de aceite.	16
4.3.3	Emulsificación.	16
4.3.4	Estabilidad de emulsión.	17
4.3.4.1	Fuerzas de superficie.	17
4.4	Proteínas de reserva.	18
5.0	ANTECEDENTES.	21
5.1	Proteínas vegetales de reserva y sus propiedades funcionales.	21
5.2	Globulinas de ajonjolí. Caracterización y propiedades funcionales.	22
5.2.1	Globulina 11S. Estructura primaria y análisis de la misma.	23
6.0	OBJETIVO GENERAL.	28
6.1	Objetivos específicos.	28
7.0	DIAGRAMA EXPERIMENTAL.	29
8.0	METODOLOGÍA Y MATERIALES.	30
8.1	Materiales biológicos.	30
8.2	Composición del aislado proteínico.	30
8.3	Cuantificación de proteína.	30
8.3.1	Determinación de proteína soluble.	30
8.3.2	Determinación de proteína insoluble.	31
8.4	Solubilidad de las proteínas del aislado.	32
8.4.1	Cambio de la solubilidad del aislado proteínico en función del pH.	32
8.5	Emulsiones.	32
8.5.1	Preparación y estabilización de emulsiones.	32
8.5.2	Ensayo de inversión de la emulsión aceite-agua.	33
8.6	Determinación de proteínas por electroforesis.	35
8.6.1	Determinación de proteínas por electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).	35
8.6.2	Determinación de proteínas por electroforesis en condiciones no-reductoras.	35
8.6.3	Determinación de proteínas por electroforesis en condiciones nativas.	36
8.6.4	Determinación de proteínas por electroforesis en presencia de urea.	36
8.6.5	Separación de proteínas mediante electroelución.	36

8.7	Extracción de las proteínas del aislado por disolución en diferentes disolventes.	37
8.8	Extracción de las diferentes fracciones de globulinas.	39
8.9	Separación de los grupos de proteínas mediante gradiente de centrifugación.	40
8.10	Separación de los grupos de proteínas mediante ultrafiltración.	41
8.11	Efecto de los inhibidores de proteasas sobre el perfil electroforético de las muestras.	41
8.12	Efecto de sales, detergentes y agentes químicos en la disolución de la muestra.	42
8.13	Determinación de pesos moleculares mediante cromatografía de exclusión molecular.	42
9.0	RESULTADOS Y DISCUSIONES.	43
9.1	Composición del aislado proteínico.	43
9.2	Comportamiento de disolución del aislado en función del pH.	44
9.2.1	Perfil de las proteínas disueltas a cada pH.	45
9.3	Formación y estabilización de emulsiones aceite-agua.	48
9.4	Extracción de las proteínas de la emulsión.	55
9.5	Separación de los grupos de proteínas mayoritarias.	58
9.5.1	Extracción de proteínas mediante disolución en distintos disolventes.	58
9.5.2	Separación de los grupos de proteínas mayoritarios según su coeficiente de sedimentación.	62
9.5.3	Separación de grupos de proteínas mediante ultrafiltración.	65
9.5.4	Separación de los grupos de proteínas mediante electroelución.	67
9.5.5	Separación diferencial de globulinas.	68
9.6	Desestimación del efecto de actividad proteolítica.	71
9.7	Efecto de algunos agentes químicos sobre la disolución de la proteína.	73
9.7.1	Efecto del agente reductor β -mercaptoetanol.	73
9.7.2	Efecto del detergente SDS.	76
9.7.3	Efecto de los compuestos tris-HCl y urea.	80
9.7.4	Efecto de la acción combinada de sales y pH en la disolución de las proteínas.	83
9.8.	Determinación de pesos moleculares.	87
10.0	CONCLUSIONES.	90
11.0	PERSPECTIVAS.	95
12.0	BIBLIOGRAFÍA.	97
13.0	ANEXOS	104

2.0 Resumen.-

Entre las semillas oleaginosas se encuentra el ajonjolí, el cual se cultiva en México y cuyas proteínas podrían constituir una alternativa para la industria, ya que como subproducto del proceso de extracción del aceite se obtiene una pasta que, una vez seca y molida da lugar a una harina que contiene entre 45%-50% de proteína y cuyo uso actual es la alimentación animal. Esta harina se produce en altas cantidades y puede representar una alternativa económica interesante para obtener otro producto de alto valor agregado, como es un aislado proteínico.

En muchos sistemas alimentarios, una de las propiedades funcionales fundamentales es la capacidad de las proteínas para formar emulsiones. Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, lo que significa que las dos fases tienden a separarse con el tiempo. La entropía del sistema y por tanto su inestabilidad disminuye, si se halla presente una sustancia anfifílica en la interfase de la emulsión. Las proteínas son moléculas anfifílicas pero difieren significativamente en las propiedades de superficie que presenta cada una. Las proteínas del aislado de ajonjolí mostraron una alta capacidad emulsificante, comparable con las proteínas de soya.

Los resultados de este trabajo muestran que la proteína mayoritariamente responsable de la capacidad emulsificante de un aislado de ajonjolí es la globulina 11S. Esta proteína se encuentra en la emulsión en forma de un multímero con peso molecular cercano a 350 kDa. Se sabe que las globulinas 11S son aisladas normalmente de distintas leguminosas como hexámeros de peso molecular entre 300 y 360 kDa.

Esta proteína, altamente insoluble, demostró ser la proteína mayoritaria del aislado de ajonjolí, y pudo ser disuelta mediante el uso de distintas intensidades de fuerza iónica. El multímero (350 kDa) se disociará principalmente en un grupo de tres bandas de pesos entre 50 y 60 kDa cuando los enlaces que la forman son rotos. El tipo de enlaces que estabilizan el multímero son tanto covalente como no covalentes y cuyas rupturas dan lugar a una serie de productos intermedios. Entre las fuerzas covalentes se encuentran enlaces disulfuro. La formación del multímero será la forma mas termodinámicamente estable de esta proteína.

Diferentes tratamientos y condiciones aplicadas sobre el aislado mostraron la presencia de otras formas, con pesos moleculares menores a 350 kDa. La ruptura del multímero en presencia de un detergente dio lugar a bandas de pesos moleculares: 250, 200-220, 150, 100-120, 70-76 y 50-60 kDa que parecen ser formas intermedias entre el multímero y el monómero (peso molecular entre 50 y 60 kDa). Se observó también la aparición, dependiente del pH y fuerza iónica, de agregados de pesos moleculares variables y superiores a 350 kDa. Creemos que por efecto del pH y fuerza iónica, el multímero se disoció en sus monómeros constituyentes, así como en distintas formas intermedias para a continuación, sufrir una agregación en formas de pesos moleculares superiores, cuestión que sugiere la acción de fuerzas electrostáticas en el proceso de desagregación-agregación.

Por último, el monómero de 50-60 kDa se disocia en dos fragmentos de pesos moleculares 20-25 y 30-35 kDa en presencia de un agente reductor, lo que firmemente permite suponer que el monómero es estabilizado por uno o varios enlaces disulfuro.

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por otros autores en globulinas de diferentes plantas. Las globulinas son las proteínas de reserva mayoritarias en los granos de leguminosas, sin embargo los trabajos realizados sobre ajonjolí son muy escasos y más aún los referentes a sus proteínas de reserva. Por ello, este trabajo representa una contribución importante a la caracterización de estas proteínas, con énfasis en su propiedad de emulsificación.

3.0 Justificación.-

La industria alimentaria se encuentra en la búsqueda de proteínas alternativas que puedan competir con las que actualmente dominan al mercado. Estas nuevas proteínas deben poseer características nutritivas, funcionales y sensoriales adecuadas a los productos en los que se aplican. La demanda de nuevas proteínas funcionales depende de muchos factores, tales como el precio, disponibilidad de proteína animal y la producción de nuevos alimentos, pero principalmente de sus propiedades funcionales. Dichas proteínas no se utilizan individualmente, sino en forma de aislados o concentrados. Para satisfacer la demanda creciente de proteínas alimentarias es necesario encontrar nuevas fuentes, ya sean convencionales (animales y vegetales) o no convencionales (microorganismos y algas), particularmente las últimas, debido a las limitaciones existentes en cuanto a tierra cultivable y energía disponible (42)

De las aproximadamente 300,000 especies de plantas conocidas, no más de 1% es usado en alimentación humana. Muchas se usan como condimentos, medicamentos o con aplicaciones herbolarias; de las restantes, la mayoría se hallan restringidas a localidades específicas (35).

La producción de proteínas alimentarias en cantidad suficiente para satisfacer las necesidades de la población mundial presenta grandes problemas, especialmente por resultar más costosa que la de carbohidratos o lípidos. El déficit de proteínas alimentarias es muy alto para algunos segmentos de la población del globo. Ante ello, la ONU, en la Asamblea General en la Cumbre Mundial sobre la Alimentación, llevada a cabo en 1996, consideró que, a pesar de los avances logrados en la disponibilidad mundial de alimentos, 800 millones de personas padecían a esa fecha de desnutrición crónica y alrededor de 200 millones de niños menores de 5 años sufrían desnutrición proteínico calórica. Se manifestó que existe la urgente necesidad de alcanzar, al más alto nivel político, el consenso y los compromisos necesarios a fin de erradicar el hambre y la desnutrición, así como lograr la seguridad alimentaria para todos mediante la adopción de políticas y planes de acción concertados que deberán ejecutar los gobiernos, las instituciones internacionales y todos los sectores de la sociedad civil (35, 56).

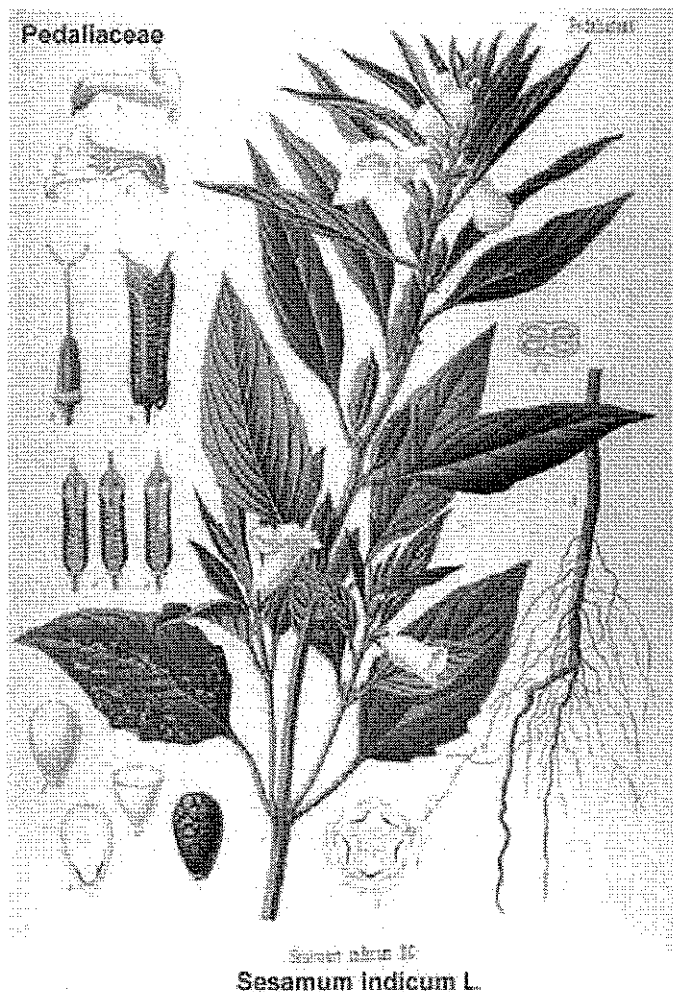
Existen evidencias que muestran la relación entre la nutrición y las enfermedades. Un ejemplo se relaciona con el hecho de que una dieta rica en alimentos de origen vegetal puede disminuir el nivel de colesterol en la sangre y así prevenir la aparición de arteroesclerosis y otras enfermedades cardiovasculares. Como consecuencia de este tipo de información, así como de distintos factores culturales y económicos, se ha observado un cambio en cuanto al consumo de proteínas y se observa una tendencia a consumir menos proteína animal y mayor cantidad de proteína vegetal (26). Entre éstas, ha tenido un gran éxito la soya, una de las leguminosas mejor estudiadas y de la que se obtienen diferentes productos proteínicos, como hidrolizados, concentrados y aislados, los cuales se utilizan en muy diversos productos en el mercado como helados, queso, salchichas y varios más, para cumplir diferentes funciones dentro de los sistemas alimenticios en los cuales se incluyen. La soya domina el mercado mundial de aditivos proteínicos funcionales.

Dentro de las semillas llamadas oleaginosas se encuentra el ajonjolí, el cual se cultiva en México y cuyas proteínas podrían ofrecer una alternativa a la industria, ya que como subproducto del proceso de extracción del aceite se obtiene una pasta que se muele y seca para dar lugar a una harina, que contiene entre 45%-50% de proteína, usada normalmente en alimentación animal (41, 76). Esta harina se produce en cantidades considerables y puede representar una alternativa económica interesante para obtener un producto de alto valor agregado como es un aislado proteínico.

4.0 Introducción.-

4.1 Generalidades.-

Las proteínas se utilizan tradicionalmente en la elaboración de productos alimenticios por su valor nutrimental y por sus propiedades funcionales. Su funcionalidad representa el conjunto de propiedades con incidencia, tanto tecnológica como organoléptica, sobre el producto final (25).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4.1.1- Planta de ajonjolí (Sesamum indicum L.)

El ajonjolí (*Sesamum indicum*) originario de África, es una planta anual eréctil de 0.5 a 2.5 metros de alto que madura entre 70 y 150 días. El fruto consiste en una vaina elíptica consistente entre dos y cuatro cámaras y cada una contiene 20 semillas, aproximadamente.

Estas miden entre 2.5-3.0 mm de longitud y, aproximadamente, 1.5 mm de ancho (Figura 4.1.1). Las semillas de ajonjolí van desde un color blanco hasta el negro, con una superficie lisa o ligeramente jaspeada (17, 40, 71). La semilla contiene aceite (50-54%), proteína (25%), carbohidratos (11%), cenizas (5%), fibra (4%) y agua (5%) (41, 75). La semilla de ajonjolí probablemente sea el condimento más antiguo utilizado por el hombre y quizá el primer cultivo generado para extraer aceite. En la antigua Babilonia se utilizaba para elaborar pasteles, vino y brandy, mientras que el aceite se usaba para cocinar y en productos de belleza. La semilla fue utilizada también por los egipcios con fines medicinales desde el año 1500 a.c. En los siglos XVII y XVIII los esclavos trajeron la semilla a América (75).

El uso principal actual de la semilla de ajonjolí es el de producción de aceite. El aceite de ajonjolí es muy apreciado debido a que posee un sabor agradable, además de que es uno de los aceites que más fácilmente es digerido por el sistema gastrointestinal humano. Compuesto por aproximadamente 43% de ácido oleico y 43% de ácido linoleico, es uno de los pocos aceites vegetales que no requieren de un proceso de refinación previo a su consumo (41, 71). Es utilizado también en la elaboración de margarinas, como ingrediente para la industria farmacéutica, en la fabricación de jabones cosméticos y en la industria de pinturas por tener una buena estabilidad. Por su efecto sinérgico, se utiliza como activador en la preparación de insecticidas piretroides (90).

Como subproducto de la extracción del aceite se genera una harina cuyo principal uso es en la alimentación de ganado, aves y otros animales. Esta harina está compuesta por alrededor de 45-50% (p/p) de proteína (41, 76), además de un 10%-20% (v/p) de aceite remanente (32, 41, 84).

Cuando a las semillas se les elimina la cutícula se emplean para comerse directamente, en el horneado de panes y para la fabricación de dulces. En México se usa para la preparación de algunos alimentos, como mole, dulces, galletas y confitería en general. En África, el ajonjolí es empleado para hacer sopas y confitería (15, 75), mientras que en algunas regiones de Asia se utiliza en la elaboración de alimentos tradicionales y particulares como el halvah, halawa y tahini (74).

En el período 1995-1999 México ocupó el 12° lugar a nivel mundial como productor, participando con 26,000 toneladas promedio anuales, lo que representó el 1% de la producción mundial. Para el año 2001 la producción nacional se incrementó a 41,000 ton. Las principales áreas productoras se localizan en los estados costeros del Pacífico, entre los que destacan Sinaloa (26.1%), Guerrero (20.96%), Sonora (19.4%), Oaxaca (14.9%) y Michoacán (4.1%). Entre las variedades que se cultivan en México destacan Pachequeño seleccionado, Primavera, Ontagota 89 y Ostimur 89, Turnioca 89, Calentana, Verde Nacional y Pungabarato (17).

México ocupó el sexto lugar como exportador para el período mencionado, con una participación a nivel mundial de 4.4%, aportando 21,968 toneladas promedio anuales. Los principales mercados de exportación son los Estados Unidos, Australia, Países Bajos e Israel (17).

Con excepción de la presencia de oxalatos en la cáscara y de ácido fítico en la semilla no hay ningún otro agente tóxico, antinutricional o generador de color en ajonjolí (75, 77), aunque recientemente se ha reportado la existencia de casos de respuesta alérgica a la semilla descascarada, éstos no representan ni siquiera el 1% de los casos de alergias alimentarias (39, 58, 59) .

4.2 Aislados proteínicos.-

Un aislado proteínico se define como la porción, principalmente proteínica, obtenida de granos limpios, sanos y de alta calidad por medio de la remoción de los componentes no proteínicos, hasta llegar a un 90% de proteína en base seca (Nitrógeno (%) x 6.5) (82).

Los aislados proteínicos se utilizan frecuentemente en productos cárnicos para mejorar la calidad y tolerancia al cocimiento, así como realzar su sabor. Son también comúnmente usados en productos horneados, para mejorar su calidad nutrimental.

Los aislados proteínicos deben poseer propiedades intrínsecas satisfactorias (ej. nutrimentales) y no aportar olores, colores ni sabores (o resabios) extraños a los productos

en los que se aplican. Además deben poseer propiedades funcionales como la solubilidad, capacidad de gelificación, de espumado, de emulsificación, estabilidad al calor, entre otros, que los hagan compatibles con los productos a los que se adicionan (9).

La figura 4.2.1 muestra el proceso de obtención del aislado de ajonjolí bajo estudio. Se puede observar que el porcentaje de proteína presente se incrementa a lo largo de la extracción y llega a ser superior al 90% de la composición del aislado.

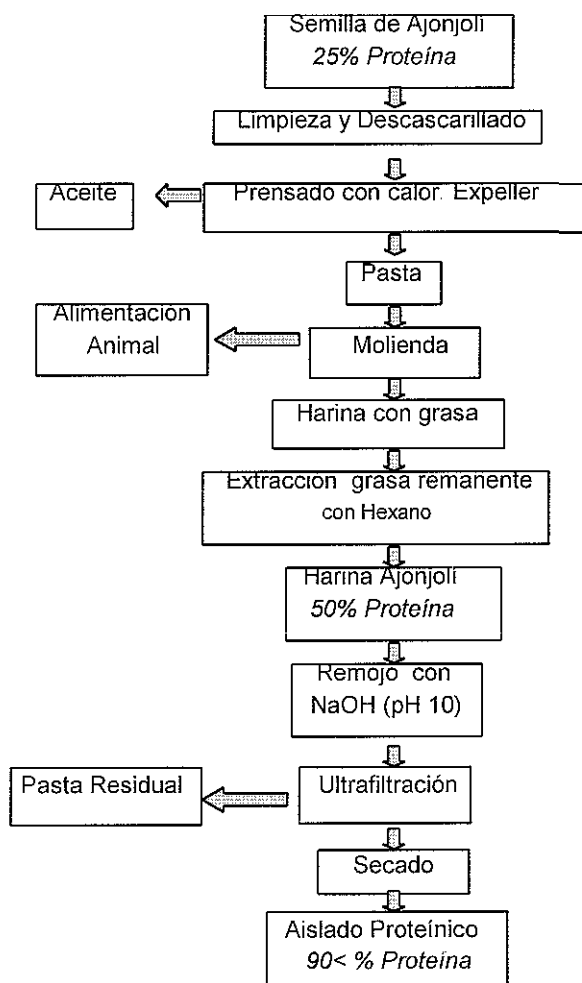


Figura 4.2.1- Diagrama de flujo que muestra el proceso de obtención del aislado de ajonjolí (*Sesamum indicum*) usado en este estudio.

4.3 Propiedades funcionales de las proteínas.-

Las propiedades funcionales se definen como las propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de las proteínas en un sistema alimentario durante su procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo (12). Las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias se pueden clasificar en tres grupos principales (9, 21):

- a) Propiedades de hidratación (dependiente de las interacciones proteína-agua). Incluyen propiedades tales como absorción y retención de agua, succulencia, hinchado, adhesión, dispersabilidad, solubilidad y viscosidad (normalmente considerada, propiedad hidrodinámica).
- b) Propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína, tales como la precipitación, gelificación y formación de otras estructuras diferentes (fibras y pastas proteínicas, por ejemplo).
- c) Propiedades superficiales. Se refieren a la tensión superficial de emulsificación y características espumantes de las proteínas.

Estos grupos no son totalmente independientes. Por ejemplo, la gelificación no solamente implica las interacciones proteína-proteína, sino también las interacciones proteína-agua. La viscosidad y la solubilidad dependen tanto de las interacciones proteína-agua como proteína-proteína (Cuadro 4.3.1).

Cuadro 4.3.1.- Propiedades funcionales de las proteínas alimentarias que intervienen en los diversos alimentos (12)

Propiedad funcional	Mecanismo	Sistemas alimenticios
Solubilidad	Hidrofilia de la proteína, dependiente del pH	Bebidas
Absorción de agua y aglutinación	Hidratación iónica y puentes de hidrógeno	Carnes, embutidos, pasteles, panes.
Viscosidad/Retención de agua.	Dependiente del tamaño y forma hidrodinámica de las proteínas	Sopa, aderezos
Gelificación	Formación de una matriz proteínica y solidificación	Productos lácteos, quesos
Cohesión/Adhesión	La proteína actúa como material adhesivo por medio de interacciones iónicas e hidrofóbicas y por puentes de hidrógeno.	Carne, salchichas, pastas, productos horneados
Absorción de grasa	Interacciones hidrofóbicas entre las grasas y la proteína	Productos de panadería Emulsificación, Formación y estabilización de emulsiones de grasa, formación de películas en interfases, Salchichas, sopa, pasteles, aderezos
Formación de espuma	Absorción en interfases y formación de películas	Betunes para pastel, mousses, helados, postres.

Es de gran importancia el llevar a cabo la evaluación sistemática de las propiedades funcionales y nutrimentales de las nuevas fuentes proteínicas, ya sean concentrados o aislados, ya que esto nos permitirá evaluar y ayudar a predecir el comportamiento de los mismos en sistemas alimenticios específicos.

4.3.1 Solubilidad.-

La solubilidad de una proteína es la manifestación termodinámica del equilibrio entre interacciones proteína-proteína y proteína-disolvente (12). La disolución ocurre por la

dispersión de las moléculas de proteínas en el disolvente. Se relaciona con cambios en las interacciones de los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos sobre la superficie de la proteína con el disolvente. Se presentan numerosas interacciones por puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e interacciones iónicas (30). La disolución está directamente relacionada con la naturaleza fisicoquímica de la superficie de la proteína, la cual a su vez es influenciada por el patrón de plegamiento de la cadena polipeptídica. La solubilidad depende principalmente del pH, fuerza iónica, tipo de disolvente y temperatura. Las proteínas presentan la mínima solubilidad a su pH isoeléctrico; pH donde la carga neta de la molécula será igual a cero. La solubilidad de la mayoría de las proteínas se ve afectada también por la desnaturalización por calor, debido a la alteración del balance de las interacciones proteína-proteína y proteína-disolvente. La proporción de residuos hidrofóbicos expuestos sobre la superficie de una proteína influye en su estabilidad termodinámica. Aunque todas las proteínas sufren desnaturalización térmica, aquéllas con mayor cantidad de estos residuos, expuestos sobre su superficie serán mas susceptibles a este fenómeno (12).

El estado final de disolución de la proteína se relaciona con otras propiedades funcionales importantes, entre ellas la emulsificación, que es una propiedad de superficie y que requiere un nivel alto de hidratación y de dispersión de la proteína (12). Las características de solubilidad son útiles para la determinación de las condiciones de extracción y purificación óptimas a partir de fuentes naturales. La disolución indica, en buena medida, las aplicaciones potenciales de la proteína, esto es debido a que el grado de no disolución o la cantidad de proteína precipitada, es el índice mas práctico que refleja tanto la desnaturalización proteínica, como la agregación de proteínas. Existe una relación entre las proteínas inicialmente existentes en estado desnaturalizado y parcialmente agregado y su capacidad para participar en la gelación, espumado y emulsificado. Por otro lado, la solubilidad casi siempre se ve reducida irreversiblemente, cuando se involucra calentamiento (94). Por último, los valores de proteína soluble a los diferentes pH son indicadores del estado de un aislado proteínico y permiten proponer el sistema alimenticio al que se puede incorporar.

4.3.2 Absorción de aceite.-

La capacidad de absorción de aceite que presentan las proteínas es muy importante para su aplicación como extensores en productos embutidos y sustitutos de carne, principalmente porque mediante esta propiedad funcional se mejora la retención de sabor así como la palatabilidad de los productos alimenticios. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la absorción parece ser la retención física del aceite en un estado sólido, semisólido o fluido (9). Las interacciones de la proteína con el aceite dependen en gran medida de la composición y conformación de la misma (52, 62).

4.3.3 Emulsificación.-

En una emulsión de dos fases, un líquido se halla disperso en otro en forma de gotas largas ($>0.3 \mu\text{m}$). Son llamadas aceite-agua (o/w) si la fase continua es agua y agua-aceite (w/o) si es al revés (23).

Una de las propiedades funcionales primarias para muchos sistemas alimentarios es la capacidad de las proteínas para formar emulsiones. Las emulsiones son dispersiones o suspensiones de dos líquidos no miscibles, aunque la estructura de la mayoría de las emulsiones alimentarias es mucho más compleja (12, 23, 52). Las emulsiones alimentarias pueden ser del tipo aceite en agua como la leche, o bien agua en aceite, como la margarina y la mantequilla. Estos productos son inestables a menos que se encuentre presente una sustancia anfifílica en la interfase entre las fases que forman la emulsión. Existen muchas proteínas que se comportan de manera anfifílica.

Las propiedades de las emulsiones estabilizadas por proteínas se ven afectadas por diversos factores. Estos incluyen factores intrínsecos, como el pH, fuerza iónica, temperatura, presencia de surfactantes de bajo peso molecular, azúcares, volumen de la fase oleosa, tipo de proteína y el punto de fusión del aceite usado. Existen también factores extrínsecos tales como el tipo y diseño del equipo, así como la intensidad del aporte energético (12, 23, 52).

Aunque la solubilidad es importante para la capacidad de emulsificación, no se requiere que la proteína posea un 100% de solubilidad. Mientras que las proteínas altamente insolubles no actúan bien como emulsificantes, no existe una relación confiable entre la solubilidad y las propiedades emulsificantes de una proteína en el intervalo de 25-80% de solubilidad, por lo que es difícil correlacionar cuantitativamente estas dos propiedades (19).

4.3.4 Estabilidad de emulsión.-

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, lo que significa que las dos fases tienden a separarse con el tiempo. Una emulsión "estable" es aquella cuyo tiempo de separación es largo (orden de meses en temperatura de refrigeración). Las gotas (fase dispersa) en una emulsión se hallan en movimiento continuo chocando entre ellas. Después de las colisiones pueden suceder tres cosas; la primera será que las gotas se separen de nuevo; la segunda, que se peguen unas a otras a través de una delgada película que las una (floculación), ó por último que varias de ellas se unan, dando lugar a una gota de tamaño mayor (coalescencia). Una vez que floculan o coalescen, las nuevas gotas precipitan o flotan mas rápidamente que las gotas individuales, cuestión que llevará a tener una emulsión no homogénea y subsecuentemente a la separación de las fases, dando lugar a una emulsión desestabilizada. Los medios por los cuales se mantiene a una emulsión estable pueden ser ya sea mecánicos o químicos, estos últimos actúan a través de la adición de aditivos que generan diferentes fuerzas de estabilización (12, 23, 52).

4.3.4.1. Fuerzas de superficie.-

Son todas aquellas fuerzas estáticas de origen molecular que actúan entre las partículas y dependen de la separación de las mismas. Dichas fuerzas dependen tanto de las propiedades de las partículas como del medio circundante. Los tipos de fuerza más comúnmente observados son tipo van der Waals, electrostáticas, inducida por un polímero, hidrofóbicas y fuerzas de hidratación. (23, 52).

4.4 Proteínas de reserva.

Durante su desarrollo, muchas semillas acumulan su reserva de proteínas en vacuolas de almacenamiento o en cuerpos proteínicos, cierto número de ellas sufre modificación proteolítica como parte de su proceso de maduración. Las proteínas de reserva 11, 7 y 2S son sintetizadas como precursores que se modifican post-traduccionalmente en dichas vacuolas a través de la acción de la enzima asparaginil endopeptidasa. En muchas proteínas 11S de reserva de diferentes especies vegetales, el sitio de corte de la enzima es un enlace peptídico único y bien conservado ubicado entre los residuos asparagina (Asn) y glicina (Gly). Tras este evento se generan dos péptidos, uno ácido y otro básico, ambos característicos de las especies maduras.

Las globulinas 11S se aíslan normalmente de leguminosas en forma de hexámeros, formadas a través de una serie de pasos, donde cada subunidad es producto de una pequeña familia de genes. La figura 4.4.1 muestra el mecanismo de formación de estas proteínas, donde los precursores de las subunidades se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso, lugar en el que es removido el péptido señal, para ser ensambladas como trímeros en el lumen del mismo retículo. También en el lumen ocurrirá la glicosilación, el plegamiento con ayuda de chaperonas y la formación de los enlaces disulfuro.

Al tiempo que son ensamblados, los trímeros son secretados a través del aparato de Golgi hasta las vacuolas de almacenamiento proteínico. Su acumulación en dichas vacuolas, se acompaña de un corte post-traducciona l en la subunidad de la pro-globulina, en el enlace Asn-Gly. La ruptura del trímero se sabe que está asociada con la aparición de hexámeros en la vacuola, esto quizás a que las modificaciones proteolíticas, causen cambios estructurales en la proteína, que estimulan dicho ensamblaje como hexámeros. Es sabido que los hexámeros formados a partir del corte del trímero, resisten posteriores cortes de la enzima, por lo que la acción de la enzima parece ser un paso previo para el correcto empaquetado de las proteínas, ya sea en las vacuolas de almacenamiento o en los cuerpos proteínicos (38, 50, 54).

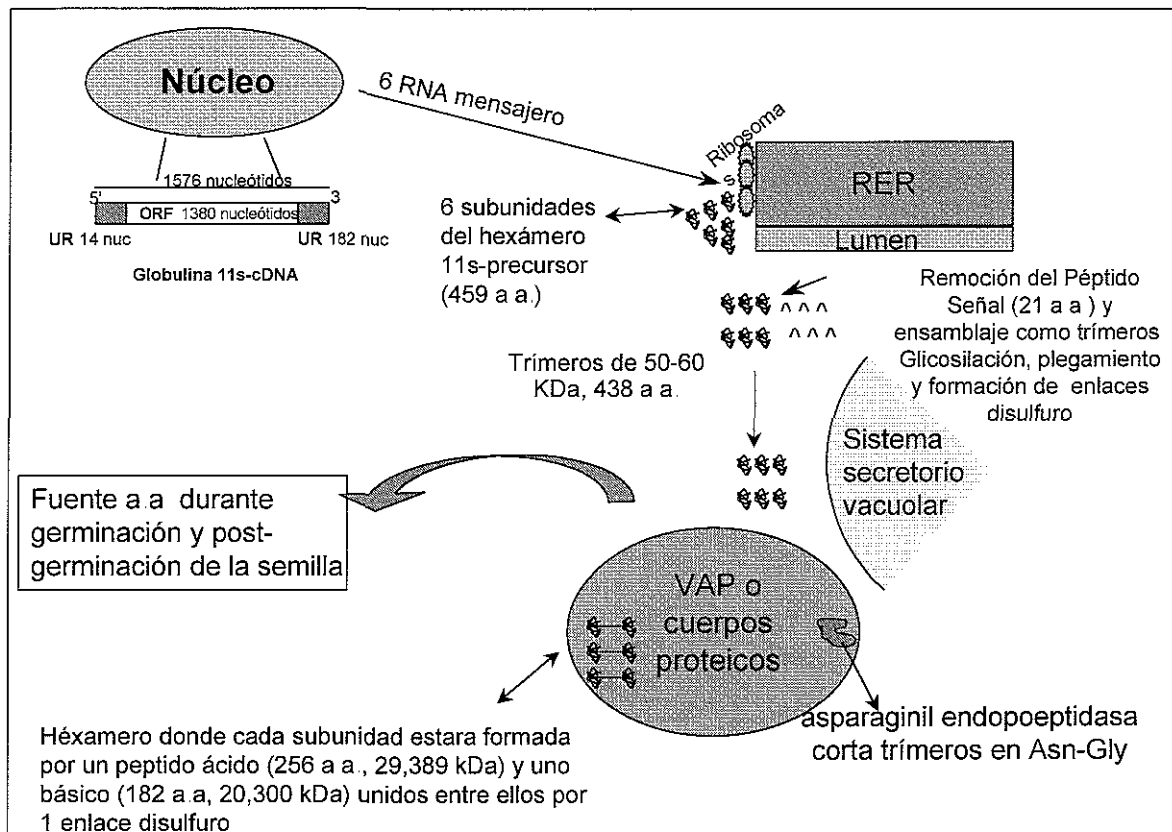


Figura 4.4.1. Mecanismo de formación de la globulina 11S en distintas leguminosas. La formación de cada una de las subunidades de la pro-globulina es dirigida por diferentes familias de genes. La pro-globulina es generada en el retículo endoplásmico rugoso (RE) y allí mismo le será removido el péptido señal. En lumen del RE las subunidades serán ensambladas en trímeros y allí también ocurrirá la glicosilación, plegamiento y formación de los enlaces disulfuro. Los trímeros serán transportados a las vacuolas de almacenamiento proteínico (VAP) a través del aparato de Golgi. Una vez en las vacuolas ocurrirá el corte post-traducciona en el enlace Asn-Gly, dando lugar a la formación del hexámero donde cada subunidad estará conformada por un péptido ácido y uno básico unidos entre si por uno o varios enlaces disulfuro (43, 61, 92).

Las globulinas son las proteínas de reserva mayoritarias en los granos de leguminosas, fueron aisladas originalmente de la semilla de *Pisum sativum* por Osborne y Campbell (1898) y luego fueron separadas en dos fracciones mayoritarias, tipo legumina y tipo vicilina. En 1949 Danielsson demostró que en muchas especies de leguminosas existen dos tipos de globulinas, con coeficientes de sedimentación de aproximadamente 7S y 11S. Con base en su coeficiente de sedimentación fueron llamadas globulinas tipo vicilina y legumina respectivamente (22).

Las proteínas de reserva desempeñan un papel importante en la alimentación humana debido al contenido elevado de éstas en las semillas y a su alto nivel de expresión y acumulación. Estas proteínas determinan el valor nutricional de la semilla (35, 89).

5.0 Antecedentes.-

5.1 Proteínas vegetales de reserva y sus propiedades funcionales.-

Las proteínas de reserva más estudiadas y donde más esfuerzos se han enfocado al estudio de sus propiedades funcionales son las de soya (*Glycine max*). Se ha evaluado la capacidad de espumado y emulsificado de las proteínas tipo 11S (glicinina) (91, 92), y de la subunidad ácida de la misma (46), demostrando la alta capacidad para formar emulsiones que presentan, además la subunidad ácida (30-40 kDa) de esta proteína presenta una mayor capacidad de emulsificación que el monómero (50-60 kDa). En un diferente trabajo (51) se estudió la relación entre la estructura y las propiedades fisicoquímicas de las subunidades de la β -conglucina de soya y se relacionó con su solubilidad y habilidad para formar emulsiones, encontrándose que las diferentes subunidades de esta proteína presentaban variaciones en las siguientes características: poder emulsificante, solubilidad, agregación térmica, estabilidad térmica y en la hidrofobicidad superficial. En el año 2000 se reporta (45) la influencia que ejercen el pH y la fuerza iónica, en la estructura molecular de la glicinina (11S) desnaturizada por calor, hallando que la forma 7S presenta una temperatura de desnaturización menor que la forma 11S, además de que la relación 7S/11S influencia el grado de desnaturización de la glicinina; un año después otro grupo (53), estudió la formación de agregados inducidos por calor en la β -conglucina (7S), encontrándose que la formación de los mismos ocurre sólo a temperaturas superiores a la de desnaturización, de lo que concluyen que para la formación de agregados, será requisito un cierto estado de desnaturización de la proteína, por otro lado, también encontraron que al incrementar la fuerza iónica, el tamaño y cantidad de los agregados también aumentó, lo mismo sucedió en relación con el tiempo de calentamiento.

En 1990 se presenta (31) un estudio sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de espumado y emulsificado de una proteína tipo 12S en *Brassica napus*. En 1996 otro grupo (29) evaluó los estados intermedios de desnaturización de globulinas de amaranto al someterlas a la acción de agentes desnaturizantes; ese año, el mismo grupo (30) estudió la estabilidad térmica en geles formados por estas mismas proteínas. Un año después, un diferente grupo (5) evaluó la digestibilidad de proteínas 11 y 7s (tipo legumina)

de cuatro distintas plantas, en función de los grados de solubilidad que presentaban, en respuesta a las diferentes agrupaciones de sus subunidades individuales, encontrando entre otras cosas que aquellas con baja solubilidad y por tanto en agrupaciones agregadas no son digeridas *in vitro* eficientemente. En 1998 (8) se estudiaron las modificaciones en la estructura de la globulina 11S de amaranto por efecto del pH y la fuerza iónica. Al año siguiente, el mismo grupo (9) evaluó el efecto que los puentes disulfuro ejercían en la estabilidad de esa misma proteína, reportando que la mayor parte de los residuos de cisteína en las formas agregadas de esta proteína, se hallan formando enlaces disulfuro; ese mismo año trabajando con la misma planta, un grupo diferente (89) purificó, cristalizó y caracterizó por rayos x a la subunidad de 36 kDa de la 11S.

Es en el año 2000, cuando se reporta (22) la separación y comparación de las principales globulinas (2, 7 y 11S) de ocho distintas especies de leguminosas, encontrándose una alta similitud en sus perfiles electroforéticos y en el coeficiente de sedimentación que sus principales subunidades presentan. Al siguiente año (87) se reporta la purificación y caracterización de las subunidades componentes de las distintas globulinas de reserva en *Vigna radiata*, encontrándose también la alta similitud que presentaba con otras plantas; este mismo año (57) se reportó la sobreexpresión, purificación y correcta renaturalización de la globulina 11S de amaranto.

5.2 Globulinas de ajonjolí. Caracterización y propiedades funcionales.-

Los trabajos realizados sobre ajonjolí son pocos y más aún los referentes a las propiedades funcionales de sus proteínas de reserva.

En lo referente a la caracterización y estructura de las globulinas de ajonjolí, en 1978 se fecha el primer reporté encontrado (32), donde se describen las subunidades componentes de la entonces llamada globulina 13S de ajonjolí, dicha descripción fue realizada a través de geles de SDS-PAGE, por lo que se reportaron sólo los fragmentos que componen al monómero (50-60 kDa). En 1980 (67) se reportan los cambios en la estructura secundaria de la α -globulina de ajonjolí después de ser sometida a diferentes agentes químicos agresivos.

En 1985 (41) se encuentra el trabajo más completo sobre características fisicoquímicas de proteínas de ajonjolí, donde se reportaron las formaciones de pesos moleculares mayores a 60 kDa, además de una estructura para la α -globulina. En lo relacionado con su solubilidad, también reportaron algunos de los disolventes utilizados para su disolución, así como el efecto del pH y de los agentes desnaturizantes sobre esa misma propiedad. El siguiente año otro grupo (63) proponen una forma y estructura cuaternaria de la α -globulina, la cual según ellos estaría formada por seis subunidades esféricas localizadas en los vértices de un octaedro. En 1988 (70) se aisló y caracterizó a la β -globulina de esta semilla, misma que se reportó con un peso molecular de 15 kDa. En 1989 y 1992 un mismo grupo (85, 86) evaluó la resistencia de la α -globulina a la acción de distintas proteasas encontrándose que esta proteína era muy resistente a la acción de la tripsina y de la quimiotripsina. Es hasta 1999 que (84) se clonaron la globulina 11S y la albúmina 2S de ajonjolí, en ese estudio se reporta la estructura primaria de dichas proteínas.

5.2.1 Globulina 11S. Estructura primaria y análisis de la misma.-

Las propiedades funcionales de las proteínas en alimentos, entre otras cosas se relacionan con la estructura que éstas presentan, es por esto que el conocimiento de dicha estructura, así como los cambios que en ella ocurran durante su procesamiento, serán condiciones esencial para mejorar su comportamiento como aditivo funcional o, como es el caso de esta proteína, para determinar las condiciones y alimentos donde pueda ser incorporada. El cuadro 5.2.1 muestra la estructura primaria de la globulina 11S reportada (84), así como la predicción de su estructura secundaria. Los tres métodos utilizados muestran la predominancia de arreglo al azar. En la predicción por Jpred (37) puede observarse aproximadamente un 18% de conformación Beta y un porcentaje similar de conformación hélice. Los valores arrojados por Gor IV (27) aunque muestran un mayor contenido de hélices, no son tan precisos como los de Jpred (López R. *Comunicación Personal*) (47). Diferentes trabajos reportan la influencia de la conformación hélice en la formación de emulsiones; en particular en proteínas globulares, las hélices formarán dos tipos de residuos uno hidrofílico orientado hacia la fase polar y otro hidrofóbico inmerso el fase apolar (10, 43, 65), sin embargo la conformación que una proteína adopte en la gota de emulsión dependerá

también de otros factores como son su flexibilidad, estructura terciaria y en algunas proteínas la estructura derivada de un comportamiento de asociación-disociación (23, 52).

Cuadro 5.2.1. Secuencia de aminoácidos de la globulina 11S de ajonjolí, 497 a.a (84) y predicción de la estructura secundaria a través de 3 diferentes métodos informáticos de predicción: Gor IV (Garnier et al., 1996) (27), Predict Protein (Burkhard Rost, Cubic) (68), JPred versión 2 (Barton Group- EMBL-European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton Cambs) (37). Todas las predicciones se realizaron a través de ExPASy Molecular Biology Server (16). Los residuos en color rojo reflejan las regiones predichas para hélices, los de color amarillo son las predicciones para conformación beta y los de color negro serán las regiones que presentan arreglo al azar.

	Gor IV	ProteinPrediction	Jpred
Hélices	35.81	18.1	18.91
Beta	17.30	24.1	18.30
Arreglo al azar	46.88	57.8	62.77

MV	FXFL	FLSLSLL	SAAIAQTREPR	L	TGGQQCRFQRISGAQPSLR	EGG
	WDERQEQFQQAGL	AIIRSTIRPNGLSLPNYHPSP	RGQ			
PGCAETYQVHRSQRTMERTEASEQQDRG	SVRDLH	QK	LRQGD	PSG		
A	NDGSED	DVNHL	SNQLDQKFR	AGGVPR	SGEQEQQA	
RQTFHNIFRAFDAELLSEAFNVPQETIRRMQSEEEER	G	RERM	RPD			
EEEEGEQEHRGRQLDNGLEETFCTMIKFR	TNVESR	READIFSRQAGR	DR			
NKLFILKYMDLSAEKGNLYSNALVSPDWSMTG	RGDA	DHNG				
QA	DRVNQGE	PQYY	AGNNGF	TTGSPMR	SPLAGY	

El análisis de la composición y tipo de aminoácidos de esta proteína puede observarse en el cuadro 5.2.2, donde se muestra que un 40% de los aminoácidos son no polares, mientras que un 25.9% presentan carga, de los cuales un 14.1% presentan carga positiva, la arginina es el aminoácido más abundante con 10.1%. Del 11.8% de aminoácidos con carga negativa, un 6.8% corresponderán al ácido glutámico. Entre los aminoácidos no polares más abundantes se hallan la leucina con 9.9%, alanina 7.2% y la valina con 6.6%. Entre los aminoácidos polares sin carga, los más abundantes serán la glicina con 7.7% y la glutamina con 6.8%.

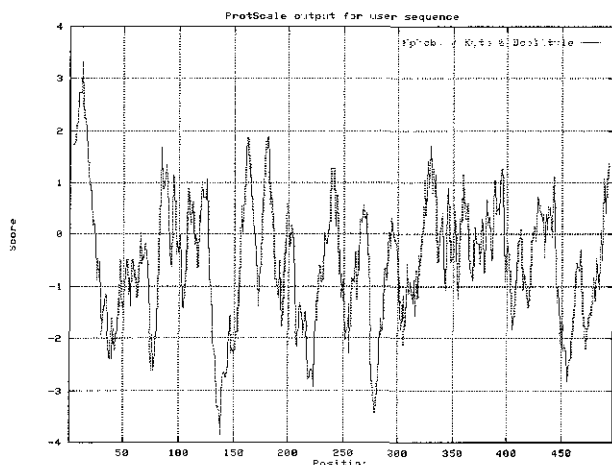
Cuadro 5.2.2. Composición de aminoácidos (%) y porcentaje de residuos aminoácidos según su polaridad de la globulina 11S de ajonjolí, basados en la secuencia reportada por Tai et al. (84).

Composición aminoácidos (%):			
Alanina	7.2 NP	Metionina	1.8 NP
Cisteína	0.8 PC0	Asparagina	4.6 PC0
Ac. aspartico	5.0 PC-	Prolina	4.4 NP
Ac. glutámico	6.8 PC-	Glutamina	6.8 PC0
Fenilalanina	4.4 NP	Arginina	10.1 PC+
Glicina	7.7 PC0	Serina	5.8 PC0
Histidina	1.6 PC+	Treonina	5.0 PC0
Isoleucina	4.2 NP	Valina	6.6 NP
Lisina	2.4 PC+	Triptofano	1.6 NP
Leucina	9.9 NP	Tirosina	3.0 PC0

Polaridad de los residuos (%):	
No polar (NP)	40.1
Polar carga - (PC-)	11.8
Polar carga + (PC+)	14.1
Polar sin carga (PC 0)	33.7

Con referencia a los requerimientos establecidos por FAO-WHO-ONU, que se basan en la ingesta diaria recomendada para un adulto sano, de cada aminoácido (Anexo I) (18), se observa la superioridad de la globulina 11S de ajonjolí, en cuanto al incremento en el porcentaje de los aminoácidos esenciales; treonina (1.6%), valina (3.1%), isoleucina (1.4%), leucina (3.3%) y triptofano (0.5%); el incremento del total de los esenciales es de 9%. El valor reportado para el total de aminoácidos azufrados es igual al de esta proteína y en lo referente al total de aminoácidos aromáticos hay un incremento del 2.7% en la 11S. Sin embargo esta proteína será limitante en el aminoácido lisina, por lo que no cubre los requerimientos reportados por la FAO-WHO-ONU (18), no obstante, los valores mostrados indican la conveniencia de mayores estudios, esto debido al aprovechamiento potencial que esta proteína parece presentar para fines de alimentación humana.

El análisis de hidrofobicidad realizado sobre la secuencia aminoácida y llevado a cabo por el método de ProtScale (69) (cuadro. 5 2.3), muestra la periodicidad de la secuencia aminoácida: no polar-polar, misma que es hallada en proteínas que eficientemente se absorben en la interfase aceite-agua, estabilizando la emulsión (42, 52).



Escala de Valores de Aminoácidos:

Ala: 1.800	Leu: 3.800
Arg: -4.500	Lys: -3.900
Asn: -3.500	Met: 1.900
Asp: -3.500	Phe: 2.800
Cys: 2.500	Pro: -1.600
Gln: -3.500	Ser: -0.800
Glu: -3.500	Thr: -0.700
Gly: -0.400	Trp: -0.900
His: -3.200	Tyr: -1.300
Ile: 4.500	Val: 4.200

Cuadro 5.2.3. Hidrofobicidad de la globulina 11S de ajonjolí. Llevada a cabo por el método de hidrofobicidad de ProtScale (Kyle and Doolittle, 1982) (69) y a través de ExPASy Molecular Biology Server (16).

En lo referente a propiedades funcionales, es hasta 1983 que se presentó el primer reporte (74), donde se evaluó la capacidad de formación y estabilización de dos tipos de emulsiones alimenticias con una harina de ajonjolí, reportándose un poder emulsificante muy parecido al de la lecitina de soya. Un año después un grupo diferente (77) evaluó las propiedades nutricionales y funcionales de una harina de ajonjolí y de sus hidrolizados enzimáticos. Es hasta doce años después (3) que se retoma el estudio de estas propiedades en esta semilla y se reporta el efecto que distintos tratamientos ejercen sobre las propiedades funcionales de una harina de ajonjolí. En 1997 (15) se evalúan y comparan las propiedades funcionales de harina de ajonjolí completa contra una desengrasada. En los años 1999 y 2002 un mismo grupo (48, 49) evalúa y compara, también las propiedades funcionales de una harina de ajonjolí, pero entre diferentes tratamientos usados tradicionalmente en el procesamiento casero de alimentos.

Exploraciones previas por parte de nuestro grupo de trabajo mostraron la alta capacidad de distintas harinas de ajonjolí para formar y estabilizar emulsiones aceite-agua. La figura 5.2.3 muestra la estabilidad de la emulsión, medida como porcentaje de aceite coalescido para dos condiciones diferentes de pH para el aislado en cuestión. Se logra observar que a temperatura ambiente y casi 6% de proteína, la fracción de aceite separada es insignificante.

6.0 Objetivo general.-

- Identificar en un aislado de ajonjolí las proteínas responsables de la formación y estabilización de emulsiones aceite-agua. A través de la caracterización bioquímica de las proteínas mayoritariamente responsables de dicha propiedad, se pretende obtener la información que permita optimizar su extracción para uso en alimentación humana.

6.1 Objetivos específicos.-

- Caracterizar el aislado proteínico en cuanto a su composición proximal y el comportamiento de disolución que presenta a diferentes valores de pH y en presencia de diferentes disolventes. Asimismo se determinará su capacidad para formar y estabilizar emulsiones aceite-agua. A través de técnicas electroforéticas se determinará el perfil de pesos moleculares de las proteínas que conforman al aislado, de la emulsión aceite-agua previamente desestabilizada y del aislado disuelto bajo las distintas condiciones.
- Aislar las proteínas responsables la capacidad de formar y estabilizar emulsiones aceite-agua
- Caracterizar las proteínas mayoritariamente responsables de la formación y estabilización de emulsiones aceite-agua en función del comportamiento de disolución que presentan a diferentes valores de pH y en presencia de distintos agentes químicos. Determinar, a través de perfiles electroforéticos, su comportamiento en presencia y ausencia tanto de un agente reductor como de un detergente. Determinar los pesos moleculares mediante el uso de cromatografía de exclusión molecular.

7.0 Diagrama experimental.-

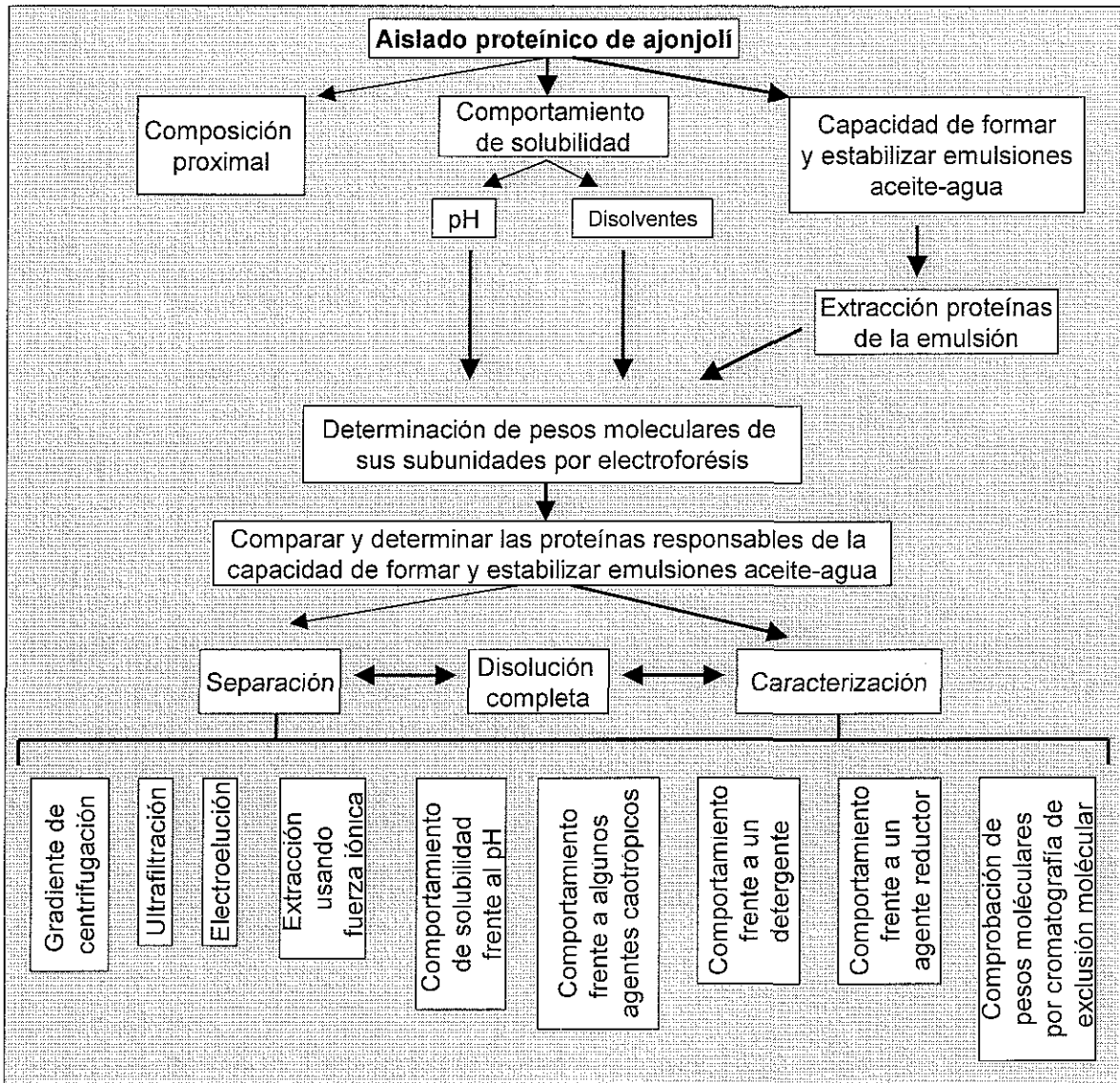


Figura 7.0. Diagrama experimental que muestra el proceso que se llevó a cabo durante la realización de este estudio.

8.0 Metodología y materiales.-

8.1 Materiales biológicos.-

La muestra inicial fue un aislado proteínico de ajonjolí (*Sesamum indicum*), de variedad desconocida, proporcionado por la empresa procesadora de ajonjolí Distribuidora Internacional de Productos Agrícolas S.A. de C.V. (Dipasa, Celaya, Guanajuato, México) y cuyo proceso de obtención se muestra en la figura 4.2.1. El aislado se almacenó hasta su uso protegido de la luz y el oxígeno y a 4 °C.

8.2 Composición del aislado proteínico.-

Se realizó según los métodos de análisis de la asociación de químicos analistas oficiales AOAC (Ed. 16th), 1995. Humedad (925.09), cenizas (923.03), extracto etéreo (920.39), fibra cruda (977.14) y proteína (962.09) (1)

8.3 Cuantificación de proteína.-

8.3.1 Determinación de proteína soluble.-

En general los métodos de determinación colorimétricos se basan en que, ciertos iones metálicos y colorantes se unen a las proteínas en radios específicos generándose color. Dentro de un rango específico de concentración proteínica, estos reactivos dan lugar a una banda de adsorción, cuya intensidad será proporcionalmente lineal a la concentración de proteína de una disolución.

En este estudio las determinaciones se hicieron según el método de Lowry soluble-SDS modificado (60). El principio se basa en la reacción en un medio alcalino de las proteínas con el ion Cu^+ . Se produce un color azul que es potenciado por la acción del reactivo Folin-ciocalteu.

A un volumen de 1 mL de disolución proteínica se le agrega un volumen igual de la siguiente disolución: 1 mL CTC (carbonato de sodio al 1 %, tartato de potasio al 0.2 % y sulfato de cobre al 0.1 %) + 1 mL NaOH (hidróxido de sodio 0.8 N) + 1 mL SDS (dodecil sulfato de sodio al 10 %). Esto se realiza con agitación en vortex. Se deja reposar 10 min a temperatura ambiente. Se procede a adicionar 0.5 mL de la disolución 1x vol. reactivo folin-ciocalteu + 5x vol. H_2O desionizada; esto se hace también en agitación y se deja reposar 30 min a temperatura ambiente. Una vez hecho esto se determina la absorbancia a 750 nm. Como referencia se empleó una curva patrón de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich Fine Chemicals, St. Louis Missouri, U.S.A.) (ver anexo II).

8.3.2 Determinación de proteína insoluble.-

La determinación se basa en una modificación del método de Lowry, reportada por García y Vázquez (24), en la que se lleva a cabo un paso previo de disolución alcalina de la proteína de la muestra a 100 °C.

A un volumen de 1 mL de disolución proteínica se le agrega un volumen igual de NaOH (hidróxido de sodio 2 N) y se calienta a 92 °C durante 30 min. Una vez enfriada se toma 1 mL y se le agrega un volumen igual de la siguiente disolución: 1 mL CTC (carbonato de sodio al 1 %, tartato de potasio al 0.2 % y sulfato de cobre al 0.1 %) + 0.75 mL NaOH (0.8 N) + 1.25 mL H_2O . Esto se realiza con agitación en vortex. Se deja reposar 10 min a temperatura ambiente. Se procede a adicionar 0.5 mL de la disolución 1x vol. reactivo folin-ciocalteu + 5x vol. H_2O desionizada; esto se hace también en agitación y se deja reposar 30 min a temperatura ambiente. Una vez hecho esto se determina la absorbancia a 750 nm. Se utiliza como referencia una curva patrón de caseína (Research Organics, Cleaveland Ohio, U.S.A.) (ver anexo II).

8.4 Solubilidad de las proteínas del aislado.-

8.4.1 Cambio de la solubilidad del aislado proteínico en función del pH.-

Se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Popineau *et al.* (66). Se preparó una suspensión del aislado con una concentración de 1% de proteína (p/v) en 30 mL de agua. Esto se realizó para valores de pH entre 2 y 12, ajustados con HCl 1 y 0.1 N (Merck KgaA, Darmstadt, Deuttschland) y NaOH 1 y 0.1 N (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J., U.S.A.), ambos grado analítico. Las determinaciones de pH se realizaron con un potenciómetro Corning® 340, mientras la disoluciones se hallaba en agitación en un agitador magnético. La suspensiones de proteína se agitaron orbitalmente en un agitador orbital, a 120 rpm durante 30 min a 30 °C. Se procedió a leer y ajustar el pH con los mismos reactivos y aparatos usados anteriormente. La lectura y el ajuste se realizó tres veces más, después de agitar bajo las mismas condiciones usadas anteriormente. Se procedió a centrifugar las disoluciones a 10,000 rpm durante 30 min, a 4 °C en centrífuga (Beckman, Palo Alto, CA, U.S.A.) J2-MC y por último se determinó la proteína soluble en el sobrenadante por la técnica de Lowry-SDS (60).

8.5 Emulsiones.-

8.5.1 Preparación y estabilización de emulsiones.-

Se realizó según el protocolo de Dargorn Scaviner Lefevre (11), que mide el efecto emulsificante de la proteína al determinar el grado de coalescencia (aceite separado). A partir del aislado proteínico, se prepararon disoluciones de proteína al 6, 8 y 10% en 65 mL de buffer de fosfatos de sodio 0.1 M y pH 7.0, se agitaron durante 30 min en un agitador orbital a 120 rpm y 30 °C. En tres ocasiones se verificó y ajustó el pH a 7.0 con HCl 1.0 y 0.1 N (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) y NaOH 0.1 y 0.1 N (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.,

U.S.A.), ambos grado reactivo. Al finalizar, se ajustó el volumen a 75 mL con buffer de fosfato de sodio.

A continuación, a las suspensiones se les agregó, 25 mL de aceite de maíz La Gloria® (Arancia Corn Products, Guadalajara, Jalisco, México). Se homogenizó a 20,500 rpm con equipo homogenizador Janke & Kunkel®, Ultraturrax® (Deutschland) TR-25 durante 2 min. Una vez generada la emulsión, se vaciaron de cada matraz, aproximadamente 11 mL en cuatro tubos cónicos de 15 mL y se centrifugaron en equipo Sol-Bat C300 a 300 rpm durante 10 min. Una vez hecho esto, se determinaron los volúmenes total, de emulsión, de precipitado, de fase acuosa y de aceite separado.

Se realizó el mismo procedimiento para concentraciones de proteína de 6 y 8% y volúmenes de aceite de 30, 40 y 50 mL en un volumen total de 100 mL.

8.5.2 Ensayo de inversión de la emulsión aceite-agua.-

El ensayo consistió en preparar una emulsión aceite-agua a la que se adicionó aceite de manera continua hasta el punto de vire en el que dicha emulsión se tornó en una de tipo agua-aceite. Se utilizó una disolución de buffer de fosfatos de sodio 0.1 M al 8% de proteína y pH 7.0, se agitó durante 30 min en un agitador orbital, a 120 rpm y 30 °C. El pH se verificó tres veces y se ajustó a 7.0 con HCl 1.0 y 0.1 N (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) y NaOH 1.0 y 0.1 N (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J., U.S.A.) ambos grado analítico. Una vez hecho esto y con homogenización simultánea en equipo homogenizador Janke & Kunkel®, Ultraturrax® (Deutschland) TR-25 se adicionó de manera lenta y continua aceite de maíz; la adición de aceite se detuvo al momento en que la emulsión aceite-agua se invirtió a agua-aceite.

Con el objeto de medir la capacidad del aislado de estabilización de la emulsión, se procedió a la desestabilización de la misma, a través del uso de fuerza centrífuga, tal y como se describe a continuación: se tomaron 125 mL de emulsión y se le adicionaron 80 mL de buffer de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7. Una vez hecha la mezcla, se centrifugó a 10,000 rpm

durante 45 min a 4 °C. Se observaron cuatro fases: emulsión, fase acuosa, precipitado y aceite; se separó la fase acuosa y el aceite por aspiración. Se repitió el lavado, la centrifugación y la separación tres veces más. Al remanente, que consta de precipitado y emulsión se le agregó en un volumen 1:1, una disolución al 6% de SDS (dodecil sulfato de sodio) y 10% de glicerol y se calentó a ebullición durante 5 min con agitación continua; una vez hecho esto se centrifugó a 15,000 rpm por 30 min y 4 °C. Se eliminó el aceite separado, la fase acuosa y la interfase por aspiración. A la emulsión y precipitado remanente se les adicionó 20 mL de agua desionizada y se agitó para lavar. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 45 min a 4°C, se eliminó la fase acuosa y el aceite. Se repitió tres veces más el lavado con agua, la centrifugación y la eliminación de aceite y fase acuosa. Se obtuvo una disolución de proteínas a la que se le realizó un lavado con éter (1:1) v/v, agitando por 5 min y con una posterior centrifugación a 10,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se evaporó el éter remanente en la campana de flujo laminar. Esta disolución se sometió a diálisis contra agua desionizada y se le cuantificó proteína soluble por el método de Lowry reportado anteriormente (60).

En un ejemplo práctico los resultados generados de este ensayo pueden leerse como sigue:

1. En un sistema donde se puso 71 mL de aceite + 29 mL de disolución de buffer de fosfatos de sodio, al 8 % de proteína, el cual se homogeneizó hasta formar una emulsión, misma que representó el 100% del total (100 mL).
2. El sistema (emulsión) se desestabilizó por acción de fuerza centrífuga dando lugar a los siguientes valores: 98.55 mL emulsión + 1.45 mL aceite separado
3. Lo cual significa que en un sistema con un volumen total de 100 mL donde 71 mL corresponden a aceite, 29 mL de disolución de buffer de fosfatos de sodio, al 8 % de proteína (8 g a proteína) se obtuvo que: por cada gramo de proteína adicionada al inicio, se generaron 12.3 mL de emulsión estable.

8.6 Determinación de proteínas por electroforesis.

Se utilizaron geles de poliacrilamida separados en dos zonas: una zona de concentración (4.5% acrilamida, pH 6.8) y otra donde se lleva a cabo la separación de las proteínas (pH 8.8). En los diferentes geles preparados se varió la concentración de acrilamida en el gel separador del 6 al 20%. Las tinciones de los geles se realizaron tanto con azul de Commasie, como con plata según lo reportado por Laemmli (44). Los reactivos y marcadores fueron marca Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, U.S.A.) y Pharmacia (Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) Todos los geles se hicieron en cámara Hoeffer® vertical con vidrios de 18 x 16 cm, ó en cámara Bio-Rad® Mini Protean® II System vertical con vidrios de 8 x 6 cm. Las fuentes de poder utilizadas en todos los casos fueron Hoeffer (Hoeffer Scientific Instruments, San Francisco, CA, U.S.A.) modelo PS 3000 y E-C® modelo 600-90.

8.6.1 Determinación de proteínas por electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).-

La determinación de las distintas proteínas bajo condiciones desnaturizantes se llevó a cabo por el método de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio) según lo reportado por Laemmli (44). El SDS es un detergente que confiere a las proteínas una carga neta negativa, en conjunto con la ruptura de los puentes disulfuro existentes por acción del agente reductor β -mercaptoetanol se logra un desdoblamiento de las proteínas con una densidad igual de carga y una forma similar. El pH del sistema se amortigua con buffer de tris a pH 6.8.

8.6.2 Determinación de proteínas por electroforesis en condiciones no-reductoras -

La visualización de los péptidos asociados a través de puentes disulfuro se realizó bajo condiciones no reductoras, por el método descrito en el inciso 8.6.1, pero en ausencia del agente reductor β -mercaptoetanol.

8.6.3 Determinación de proteínas por electroforesis en condiciones nativas-

La visualización de las proteínas en su forma nativa se determinó utilizando el mismo sistema de electroforesis usado anteriormente, pero en ausencia tanto de β -mercaptoetanol como de SDS.

8.6.4 Determinación de proteínas por electroforesis en presencia de urea -

Las proteínas que presentan alta hidrofobicidad usualmente presentan problemas de movilidad en electroforesis SDS-PAGE, gracias a la disociación incompleta de sus subunidades y/o a una limitada solubilidad en el gel. Para solucionar este problema se incorpora una alta concentración de urea. El procedimiento es el mismo que para el SDS-PAGE, con la excepción de que la urea se adiciona tanto en el gel concentrador como en el separador. Se utilizaron disoluciones de urea de 3, 6 y 9 M y esta se adicionó tanto en la muestra como en gel separador y en el concentrador.

8.6.5 Separación de proteínas mediante electroelución-

Se realizaron varios geles preparativos con el fin de cortar las bandas correspondientes a las proteínas de 50-60 kDa para luego electroeluir las. Todos los geles se hicieron en cámara Hoeffer (Hoeffer Scientific Instruments, San Francisco, CA, U.S.A.) vertical con vidrios de 18x16 cm. Se usaron peines separadores de 1.5, 0.75 mm y un separador que permitió un espacio de 5.25 mm, con lo que se logra cargar un volumen de 15.75 mL.

La electroelución se llevó a cabo en equipo Hoefer Gel Eluter (Hoeffer Scientific Instruments, San Francisco, CA, U.S.A.). Se realizaron varias electroeluciones de las bandas

cortadas de los diferentes geles, se colectaron en el mismo buffer de cámara de electroforesis y se liofilizaron los eluidos por 2 horas para concentrar la proteína en un equipo Labconco, Freeze Dry System, Freezone 4.5 (Labconco Corporation, Kansas City, Missouri, U.S.A.).

8.7 Extracción de las proteínas del aislado por disolución en diferentes disolventes.-

Se usó la técnica de extracción secuencial de proteínas, que se basa en los protocolos de Shewry P. R. *et al.* (79, 80), y cuyos fundamentos son la solubilidad que diferentes proteínas presentan contra diferentes disolventes, según la clasificación dada por Osborne y Mendel (1914), la cual es la siguiente:

Albúminas: Solubles en agua. Solubilidad no afectada por concentraciones salinas razonables.

Globulinas: Insolubles en agua. Solubles en soluciones salinas diluidas. Insolubles a altas concentraciones de sal.

Prolaminas: Solubles en etanol al 70%.

Glutelinas: Solubles en ácidos o bases diluidos.

El desarrollo de la técnica se muestra en la figura 8.7.1

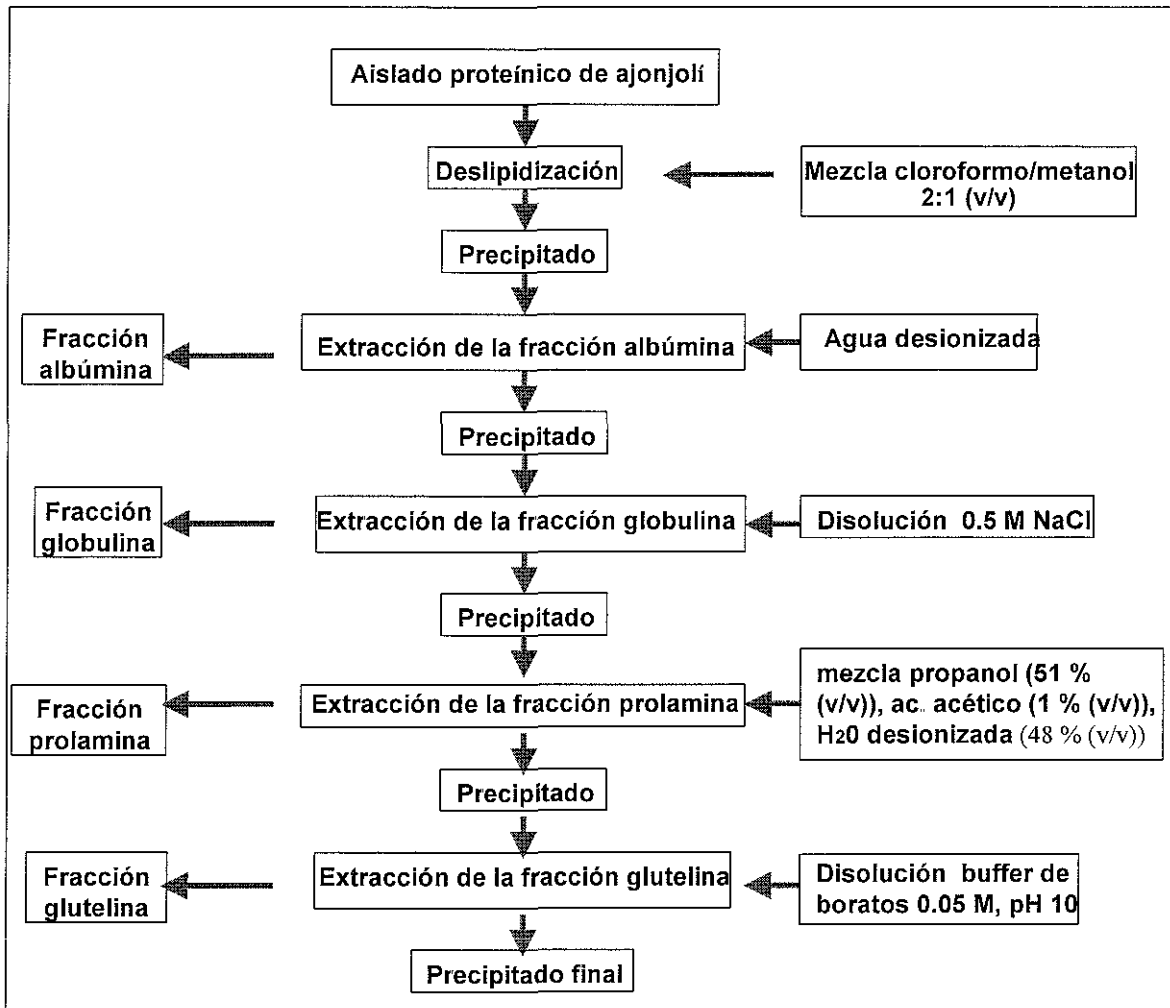


Figura 8.7.1. Extracción secuencial de proteínas. La extracción de las diferentes fracciones proteínicas se realizara según los protocolos de Shewry P. R. et al, 1983 y 1996, que se basa en la clasificación de Osborne y Campbell. Todos los lavados se harán con agitación orbital, en un radio de disolvente:proteína (10:1 (v/p)) partiendo de 3 g de proteína inicial por repetición; los lavados serán precedidos de centrifugación a 8,000 rpm (rotor J3S.1) durante 30 min y 4 °C. Se realizarán 3 lavados secuenciales por fracción proteínica y cada determinación se realizará por triplicado.

8.8 Extracción de las diferentes fracciones de globulinas.-

La extracción secuencial de globulinas se realizó con base en la separación de las distintas globulinas según el protocolo utilizado para extracción secuencial de proteínas modificado en este trabajo. El desarrollo del mismo se muestra en el diagrama de la figura 8.8.1

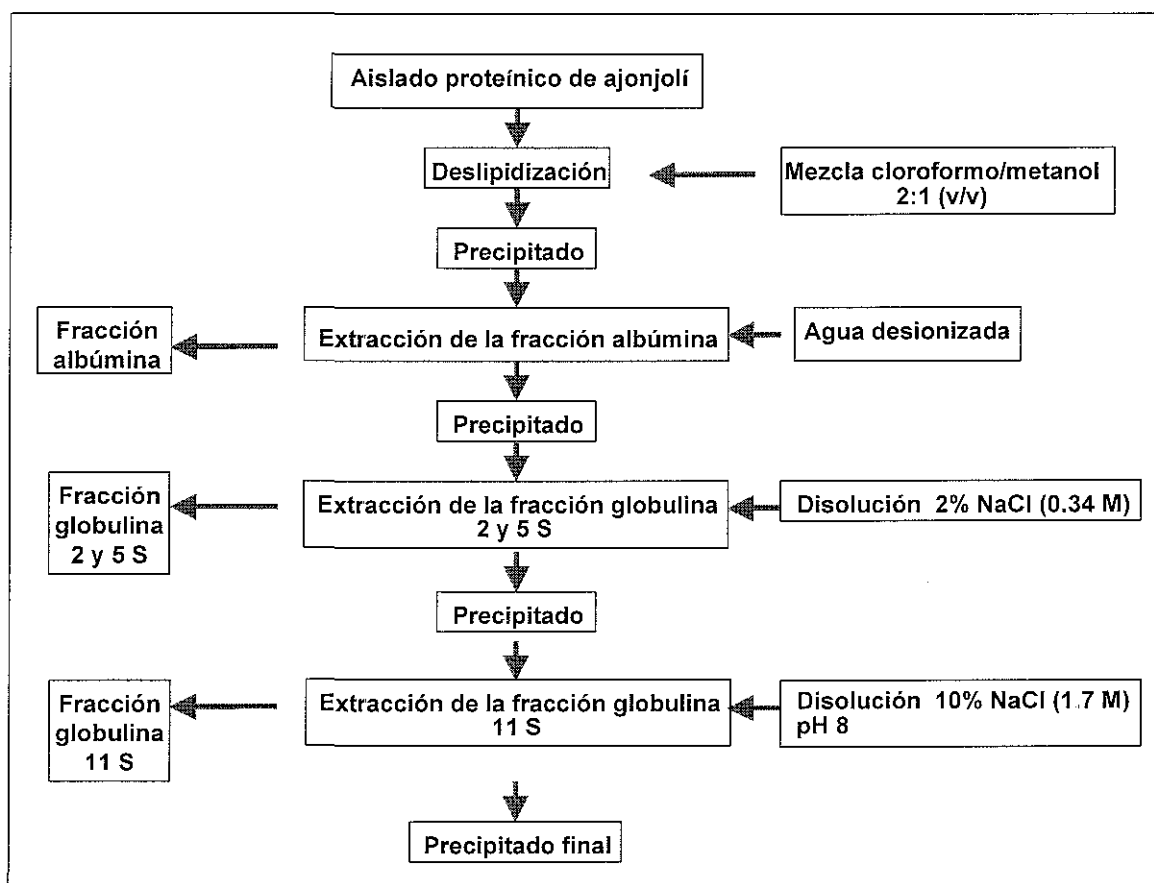


Figura 8.8.1. Extracción secuencial de globulinas. La extracción de las diferentes fracciones proteínicas se realizara según los protocolos de Shewry P. R. et al, 1983 y 1996, que se basa en la clasificación de Osborne y Campbell. Todos los lavados se harán con agitación orbital, en un radio de disolvente:proteína (10:1 (v/p)) partiendo de 3 g de proteína inicial por repetición; los lavados serán precedidos de centrifugación a 8,000 rpm (rotor J3S.1) durante 30 min y 4 °C. Se realizarán 3 lavados sucesivos por fracción proteínica y cada determinación se realizará por triplicado.

8.9 Separación de los grupos de proteínas mediante gradiente de centrifugación.-

Se usó el protocolo de Tai *et al.* (84), el cual se basa en someter una disolución de proteínas, las cuales se hallan inmersas en un medio viscoso (que impedirá su libre precipitación), a la acción de fuerza centrífuga con el propósito de obtener una separación selectiva de los diferentes grupos de ellas, en base a su coeficiente de sedimentación. Es por esto que las proteínas de masa menor requerirán de una fuerza centrífuga mayor para lograr su precipitación que aquellas proteínas de mayor masa.

Para llevar a cabo dicha técnica se partió tanto de aislado proteínico como de la emulsión desestabilizada. Para el caso de aislado de ajonjolí se adicionaron 50 g de éste a 125 mL de la disolución; 10 mM de buffer de fosfatos de sodio, pH 7.5 y 6 M de sacarosa. En el caso de emulsión desestabilizada se partió de 2 mL de la misma y 20 mL de la disolución de buffer de fosfatos-sacarosa.

Las mezclas se agitaron 1 hora a 4 °C en agitador orbital a 120 rpm, se transfirieron a una ultracentrífuga Beckman (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, U.S.A.) XL-90 a 10,000 rpm por 15 min y 4 °C. El precipitado se guardó para el ensayo electroforético, en tanto que el sobrenadante, después de ajustarle el volumen a 125 mL con una disolución de buffer de fosfatos de sodio 10 mM, pH 7.5 y 6 M de sacarosa, se sometió a centrifugación en el mismo equipo con una fuerza centrífuga de 100,000 g, durante 90 min. Tanto el precipitado como el sobrenadante se analizaron también por electroforesis.

Se procedió de la misma forma reportada anteriormente para la emulsión desestabilizada. Tanto el precipitado de la centrifugación a 10,000 g como el de 100,000 g se disolvieron de manera secuencial con tris-HCl 1.5 M, pH 6.8, urea 3 M y el buffer de tratamiento usado normalmente en electroforesis (49), este último tanto con, como sin β -mercaptoetanol.

8.10 Separación de los grupos de proteínas mediante ultrafiltración.-

Se realizó con equipo Amicon (Amicon Inc. Beverly, MA, U.S.A.) con membranas de límite de exclusión de 30,000 y 50,000 Da (YM 30 y YM 50) y presión de 200 kPa. La muestra usada fue la emulsión desestabilizada, disuelta con tris-HCl, pH 6.8, y urea 3 M. El retenido de la membrana se lavo tres veces con 1 mL de disolución 0.34 M de NaCl.

8.11 Efecto de los inhibidores de proteasas sobre el perfil electroforético de las muestras.-

Se verifico la presencia de proteasas, mediante el uso de inhibidores de proteasas. Las muestras disueltas con 0.34 M y 1.7 M de NaCl, fueron obtenidas tal y como se describe en la extracción secuencial de globulinas. El primer paso fue la centrifugación de la muestra a 10,000 rpm por 12 min. El siguiente paso consistió en ultrafiltrar el sobrenadante de la centrifugación con membrana de límite de exclusión 50,000 Da (YM 50), (Amicon Inc. Beverly, MA, U.S.A.) con el fin de eliminar las proteínas de peso menor a 50 kDa. El paso de digestión se realizó con el precipitado retenido en la membrana y extraído de la misma con 1 mL de NaCl 0.34 M y posteriormente diluido con 10 mL de H₂O desionizada, al que se le adicionó 70 µL de la mezcla de inhibidores de proteasas (Complete®, La Roche Ltd, Basel, Switzerland), que inhiben un amplio rango de serin , cistein y metalo proteasas, así como calpainas.

Una tableta de inhibidor se disolvió con agitación en 1,250 µL de buffer de fosfatos de sodio (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) y la dilución se mantuvo en contacto con la preparación durante 1 h, pH 7.0, 20 °C. El último paso consistió en una ultrafiltración en equipo Amicon (Amicon Inc. Beverly, MA, U.S.A.), y membrana YM 30, para eliminar la fracción de bajo peso, producto de degradación de proteasas que pudo generarse antes de ser inhibidas por el cocktail. El SDS-PAGE se realizó de manera inmediata.

8.12 Efecto de sales, detergentes y agentes químicos en la disolución de la muestra.

Las disoluciones con SDS se realizaron a concentraciones del detergente de 0.0, 0.003, 0.1 y 0.5 M y durante tiempos de 0, 30 min, 60 min y 96 h. El tris-HCl se usó en concentración de 1.5 M y pH de 6.8, 8 y 9, mientras que la concentración de la urea fue de 3, 6 y 9 M.

En el caso de los ensayos con pH y sales se utilizó como muestra la emulsión desestabilizada. Las sales y valores de pH que se combinaron fueron los siguientes: NaCl 0.34 y 1.7 M, llevados a pH 8, 9, 10 y 11; Tris HCl 1.5 M, pH 8.0, 9.0 y 10.0. Las mezclas se realizaron 1:1 (v/v) ó 1:2 (v/v).

Todas las disoluciones se mezclaron en vortex y se sometieron a ebullición. Los ajustes de pH se hicieron con NaOH 1 N y HCl 1 M.

8.13 Determinación de pesos moleculares mediante cromatografía de exclusión molecular.-

Se usó cromatografía de exclusión molecular. La fase estacionaria fue Superdex® 200, la fase móvil fue Tris 0.02 M, NaCl 0.3 M, pH 7.8. Se inyectaron 5 mL de muestra. En algunos de los ensayos la muestra se diluyó volumen a volumen con la fase móvil; en los demás ensayos la muestra se inyectó directamente sin diluir. Previamente todas las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 1 min. Las fracciones recolectadas variaron entre 0.0625 y 0.125 mL/min, según el ensayo.

9.0 Resultados y discusión.-

9.1 Composición del aislado proteínico.-

La primera etapa del trabajo consistió en caracterizar el aislado proteínico, con el fin de determinar si se trataba de un aislado proteínico, de acuerdo con la concentración de proteína que define a estos productos, y que debe ser mayor de 90% (82). Los niveles de lípidos y carbohidratos resultan importantes por su posible participación en las propiedades emulsificantes.

Cuadro 9.1.1.- Composición proximal del aislado de ajonjolí.

<u>Composición</u>	<u>%</u> <u>(g / 100 g)</u>
Humedad	4.1
Cenizas	1.8
Extracto etéreo	0.9
Proteína (x 6.25)	92.8
Fibra cruda	0.0
Hidratos de carbono (Fenol sulfúrico)	0.4

Tal y como se muestra en el cuadro 9.1.1, el análisis proximal mostró un contenido de proteína de 92.8%, el cual se encuentra por encima de los mínimos requeridos para ser considerado un aislado proteínico. Los valores para carbohidratos y grasa son bajos. Estos valores eran de esperarse en el caso de lípidos, debido al tratamiento previo al que fue sometido el aislado, que incluía un tratamiento con calor y prensado por equipo "expeller" con el fin de extraer la mayor cantidad de aceite, así como una posterior extracción del aceite remanente con hexano, disolvente no-polar.

9.2 Comportamiento de disolución del aislado en función del pH.-

La posibilidad de observar diferentes propiedades de las proteínas depende del comportamiento que éstas experimentan en disolución. Por tanto, ésta fue la primera caracterización llevada a cabo.

La figura 9.2.1 y el cuadro del Anexo III, muestran la solubilidad del aislado al variar el pH entre 2 y 12. Se observa un patrón común para muestras proteínicas, en el que se presenta un incremento en la disolución del aislado hacia ambos lados del punto donde se presenta la menor disolución del aislado. En este caso, la menor disolución se encontró entre valores de pH de 6 y 7, donde el número de cargas positivas es equivalente al de negativas, y al no existir repulsión entre cargas, las proteínas precipitan, dejando de ser solubles. La disolución del aislado es superior al 50% a pH de 2, 4 y 10; superior al 70% para pH 3 y mayor a 100% para pH 11 y 12. La alta disolución en condiciones de pH extremo se debió al mayor desplegamiento que las proteínas sufrieron, como consecuencia de mayores cargas parciales, que incrementaron la repulsión electrostática entre aminoácidos con carga del mismo signo y entre moléculas diferentes con cargas netas mayores. Este desplegamiento mayor, incrementó a su vez la solvatación de la proteína al exponer mayor número de residuos polares al contacto con el disolvente. De la misma manera, a valores de pH extremo la proteína expondrá un mayor número de otro tipo de residuos, como es el caso de aminoácidos aromáticos. El fundamento de esta técnica de determinación de proteína, se basa en que la señal de absorción será mayor, mientras mayor sea el número de átomos de cobre unidos a aminoácidos aromáticos; por lo que la sobreestimación de proteína observada para valores de pH de 11 y 12, creemos se debió al mayor número de residuos aromáticos expuestos en esas condiciones de pH.

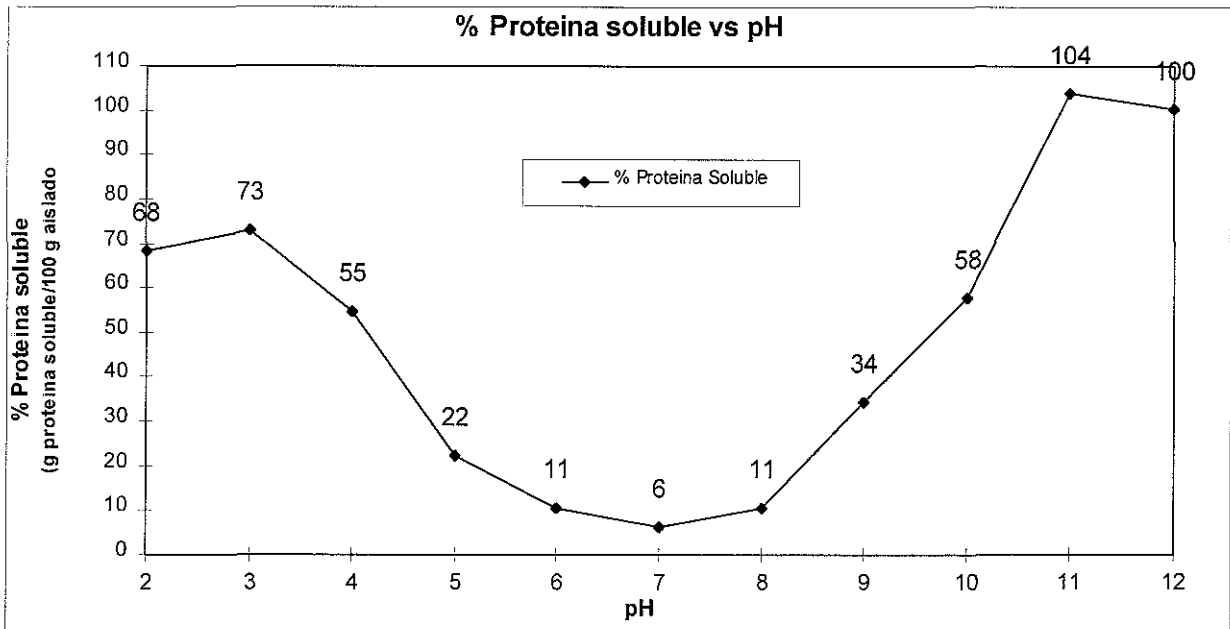


Figura 9.2.1. Comportamiento de disolución del aislado proteínico al variar el pH entre 2 y 12. Se reporta el contenido porcentual de proteína soluble. Se preparó una suspensión del aislado con una concentración de 1% de proteína (p/v) en 30 mL de agua, según el protocolo de Popineau *et al.* La curva patrón se realizó con albúmina sérica bovina. Los resultados representan el promedio de tres repeticiones.

9.2.1 Perfil de las proteínas disueltas a cada pH.-

Proseguimos con la determinación de las proteínas del aislado, disueltas a los diferentes pH, con el fin de que, después de compararlas contra las que se encuentran presentes en la emulsión, proponer alternativas para su disolución y separación del resto.

Con este objetivo, se realizaron los patrones electroforéticos de las diferentes disoluciones. La figura 9.2.1.1 muestra el perfil electroforético (SDS-PAGE) del aislado disuelto a diferentes valores de pH (2-12). En todos los valores de pH se observa un gran número de bandas, que van desde 11 (pH 5) hasta 22 (pH 10). Los perfiles proteínicos obtenidos muestran la recurrencia de un triplete con pesos moleculares entre 30 y 35 kDa y de un doblete, con pesos entre 20 y 25 kDa. Asimismo se observó la presencia menos abundante de un triplete de entre 50 y 60 kDa.

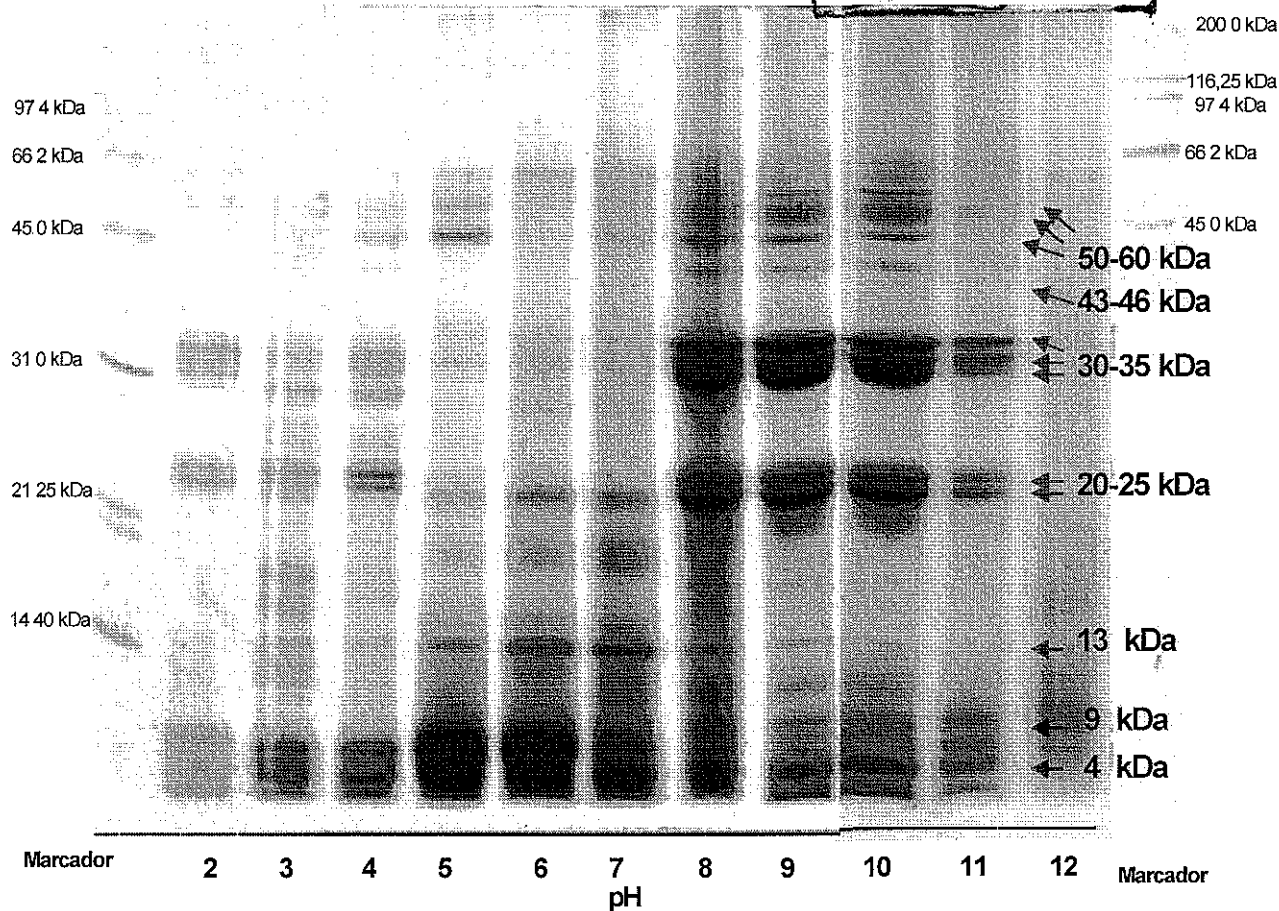


Figura 9.2.1.1. Perfil de proteínas disueltas en función del pH. SDS-PAGE del aislado disuelto a pH de 2 a 12. Separado en geles al16% de acrilamida y en presencia β -mercaptoetanol.

También se observó la presencia de bandas de pesos moleculares 9 y 4 kDa en todos los pH, siendo mas abundante en pH de 5 y 6, así como una banda de entre 13 y 14 kDa; ambas concuerdan con la proteína reportada como albúmina 2S, de peso molecular 13 kDa en condiciones nativas y de 9 y 4 kDa para la misma proteína sometida a condiciones reductoras. Por último, destacan tres bandas de peso molecular 28, 64 y 43 kDa, la última no encontrada hasta el momento en ningún reporte previo sobre proteínas de reserva en leguminosas. A pH básicos (8-11) se observa una mayor abundancia del conjunto 30-35 kDa y el de 20-25 kDa. Se considera que a estos valores de pH el aislado tiene una carga neta negativa y se presenta mayor repulsión entre sus aminoácidos cargados y, por consiguiente, un mayor desdoblamiento de la cadena, dejando a sus enlaces disulfuro más accesibles para ser reducidos por el β -mercaptoetanol. Estas bandas son más abundantes a pH básicos que en ácidos, muy probablemente porque las proteínas del aislado presentan mayor concentración de aminoácidos expuestos con carga negativa. Otros autores (4, 5, 6, 13)

reportan resultados similares en globulinas de otras plantas. En el intervalo de pH alrededor del punto donde la disolución del aislado es menor (5-7) se observa una abundancia del conjunto 8-10 kDa, lo que indica que este grupo en particular es más soluble a esos valores de pH.

El perfil electroforético obtenido (Figura 9.2.1.2) en ausencia del agente reductor β -mercaptoetanol, muestra como bandas predominantes en todos los pH evaluados, al grupo de 50-60 kDa, siendo mucho más abundantes a pH básicos. Así mismo abundantes, pero en menor concentración, se observan los grupos de 30-35 y 20-25 kDa. También se observan bandas de mayor peso molecular, 76, 100, 120, 150, 220, 250 kDa. Respecto al intervalo de pH donde se presentó la mínima disolución del aislado, también es más evidente la presencia de un grupo de proteínas por debajo de los 15 kDa.

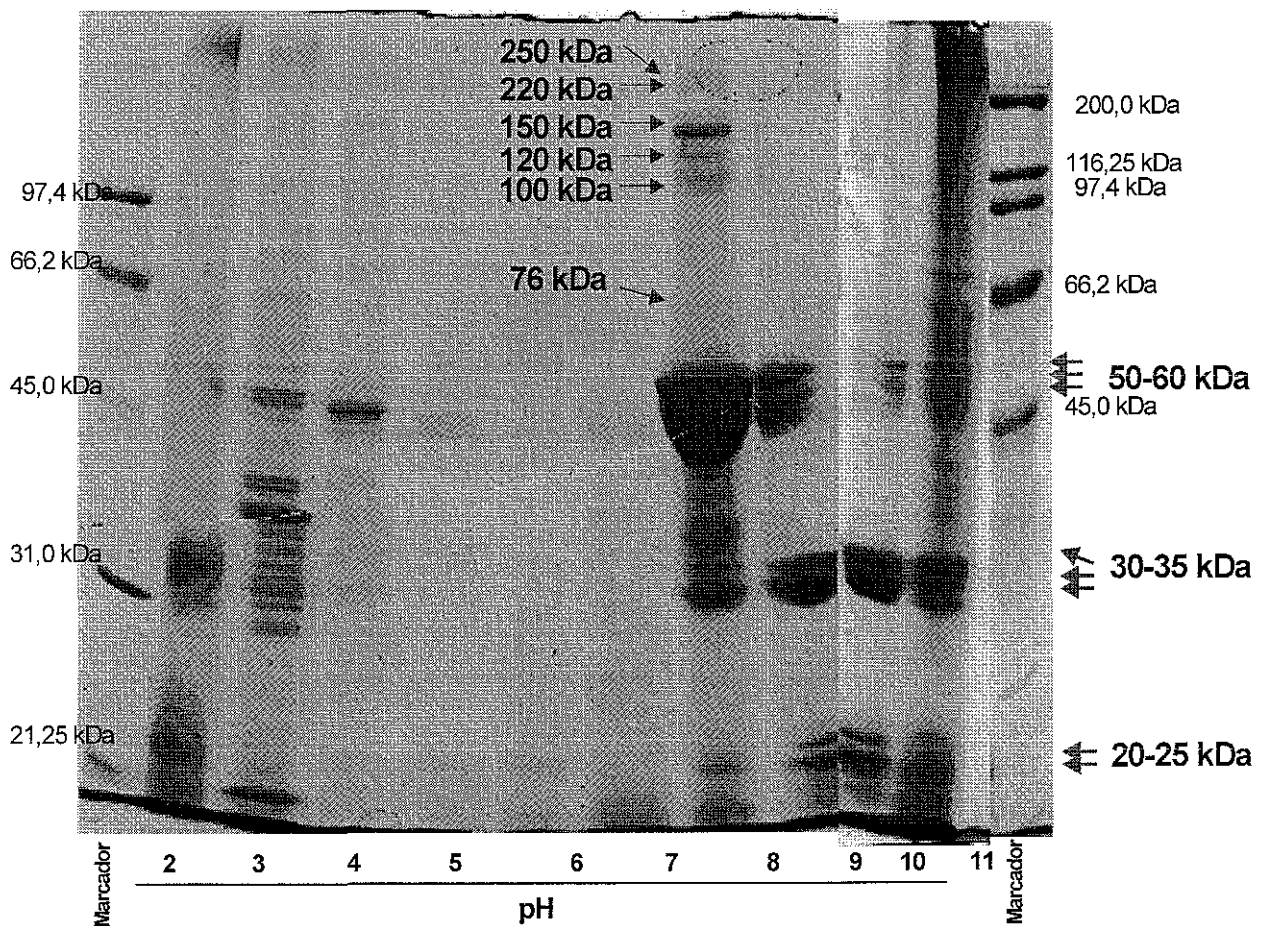


Figura 9.2.1.2. Perfil de proteínas disueltas en función del pH. Perfil electroforético sin β -mercaptoetanol del aislado disuelto a pH de 2 a 11. Separado en gels al 10% de acrilamida en presencia de SDS.

En ausencia de un agente reductor el grupo de bandas más abundantes en casi todos los pH es el de 50-60 kDa. En su presencia, las más notables corresponden al grupo de 20-25 y 30-35 kDa. Estos grupos de proteínas coinciden con los reportados en la literatura como pertenecientes a globulina 11S de ajonjolí; -multímero de 300-360 kDa que bajo condiciones desnaturalizantes tiende a disociarse en monómeros de entre 50 y 60 kDa, mismos que bajo condiciones reductoras se disocian a su vez en sus subunidades fundamentales, las cuales son la llamada ácida (30-40 kDa) y básica (20-25 kDa) (41, 84).

Los resultados en ausencia del agente reductor muestran la presencia mayoritaria en todos los pH, excepto 6-7, de un triplete de proteínas de peso entre 50 y 60 kDa. La disminución en la intensidad de los grupos de 20-25 y 30-35 kDa para esos mismos valores de pH, sugiere que en la formación de las de 50-60 kDa, participan las subunidades de 20-25 y 30-35 kDa.

Las bandas de pesos moleculares mayores (250, 220, 150, 120, 100 y 76 kDa) no se hallan presentes en presencia del agente reductor, lo que parece indicar que en su formación participan enlaces disulfuro.

9.3 Formación y estabilización de emulsiones aceite-agua.-

Se determinó la estabilidad de la emulsión del aislado proteínico, según el método de resistencia a la coalescencia (11), que mide el efecto emulsificante de la proteína contra la coalescencia (aceite separado), después de someter una emulsión a la acción desestabilizadora de la fuerza centrifuga. El cuadro 5.2.3 muestra los resultados de la estabilidad de la emulsión a concentraciones de proteína que van desde 0.1 hasta 5.81% (p/v). Los resultados aquí expuestos se compararon contra los obtenidos para un aislado de soya comercial (ArdexF®), con el que, a concentraciones de 0.5, 1.0 y 5.0% de proteína, se obtuvo también un 0% de aceite coalescido (Anexo IV). En el aislado de ajonjolí para el valor máximo de proteína adicionada (5.81%) se obtuvo únicamente 2% de aceite coalescido (v/v). Debido a que al aumentar la concentración de proteína, se observó un incremento en la cantidad de aceite incorporado en la emulsión, se decidió como primer paso experimentar con concentraciones de proteína superiores (6, 8 y 10% (p/v)), y manteniendo el volumen de

aceite constante (25% v/v). Bajo todas las concentraciones de proteína usadas se logró un 0% de aceite coalescido (cuadro 9.3.1). También se observó que al aumentar la concentración de proteína entre el 6 y 10%, aumentaba el volumen de la emulsión generada en un 4%, así como del precipitado en un 9%, a expensas de la disminución de la fase acuosa en un 13%. El volumen de la emulsión representó un 36% para el caso de 6% de proteína, 39% para el de 8% de proteína y 40% para 10% de proteína. El aumento en los valores de emulsión junto con la disminución en los de la fase acuosa nos llevó a pensar que al menos la proteína soluble se encontraba como participante en la formación de emulsiones.

Cuadro 9.3.1. Estabilidad de emulsión. Resultados de la desestabilización de la emulsión aceite-agua, estabilizada con concentraciones de 6, 8 y 10% (p/v) de proteína. Se mantuvo el volumen de aceite constante y en un 25% (v/v).

Proteína adicionada al inicio (% p/v)	Total de aceite incorporado para generar la emulsión (% v/v)	Aceite liberado después de la desestabilización de la emulsión (% v/v)	Emulsión estable después de la desestabilización (% v/v)	Precipitado después de la desestabilización (% p/v)	Fase Acuosa después de la desestabilización (% v/v)	Relación: emulsión estable / Aceite inicialmente adicionado (v/v)	Relación: emulsión estable / Proteína inicialmente adicionado (v/p)
6	25	0	36	8	56	1.45	6.03
8	25	0	39	13	48	1.57	4.89
10	25	0	40	17	43	1.61	4.02

Como consecuencia de estos resultados, y con la premisa de que la proteína soluble, que aún se hallaba en solución, era capaz de incorporar mas aceite a la emulsión, se decidió aumentar el porcentaje de este. En función de que la variable a evaluar en este punto era el aceite, se optó por probar únicamente con dos concentraciones de proteína. Se utilizó 6 y 8% de la misma; se omitió la condición de 10% de proteína debido a que la diferencia en el volumen de emulsión estable fue solo de 1%, en relación a la condición donde se uso 8% de proteína. Los porcentajes de aceite usados fueron de 30, 40 y 50% (v/v). Los resultados pueden observarse en los cuadros 9.3.2 y 9.3.3. En concordancia con las observaciones previas, en todos los casos se mantuvo un 100% de integración de aceite, y entre los valores máximos (50%) y mínimos (30%) de aceite, puede observarse también, un aumento del volumen de emulsión (28% para 6% proteína y 35% para 8% de proteína) y una disminución

de la fase acuosa (25% para 6% de proteína y 29% para 8% de proteína). También se observó que el volumen de precipitado disminuyó en un 4% para el caso de la concentración de proteína 6%, y en el de la de 8% el volumen del precipitado se redujo en un 6%, cuestión que indicaba la posible participación, también, de proteína insoluble en la formación de emulsiones.

Cuadro 9.3.2. Estabilidad de emulsión. Resultados de la desestabilización de la emulsión aceite-agua, estabilizada con 6% (p/v) de proteína. Se varió el volumen de aceite en 30, 40 y 50% (v/v).

Proteína adicionada al inicio (% p/v)	Total de aceite incorporado para generar la emulsión (% v/v)	Aceite liberado después de la desestabilización de la emulsión (% v/v)	Emulsión estable después de la desestabilización (% v/v)	Precipitado después de la desestabilización (% p/v)	Fase Acuosa después de la desestabilización (% v/v)	Relación: emulsión estable / Aceite inicialmente adicionado (v/v)	Relación: emulsión estable / Proteína inicialmente adicionado (v/p)
6	30	0	43	8	50	1.42	7.11
6	40	0	55	7	38	1.38	9.18
6	50	0	71	4	25	1.42	11.81

Cuadro 9.3.3. Estabilidad de emulsión. Resultados de la desestabilización de la emulsión aceite-agua, estabilizada con 8% (p/v) de proteína. Se varió el volumen de aceite en 30, 40 y 50% (v/v).

Proteína adicionada al inicio (% p/v)	Total de aceite incorporado para generar la emulsión (% v/v)	Aceite liberado después de la desestabilización de la emulsión (% v/v)	Emulsión estable después de la desestabilización (% v/v)	Precipitado después de la desestabilización (% p/v)	Fase Acuosa después de la desestabilización (% v/v)	Relación: emulsión estable / Aceite inicialmente adicionado (v/v)	Relación: emulsión estable / Proteína inicialmente adicionado (v/p)
8	30	0	45	10	45	1.51	5.68
8	40	0	61	8	31	1.52	7.62
8	50	0	80	4	16	1.59	9.96

Los resultados presentados indicaron que la proporción porcentual de emulsión aumentaba, tanto si el sistema era enriquecido con un mayor porcentaje de aceite como de proteína. Debido a la alta capacidad del aislado de formar emulsión estable, se decidió verificar cuál era el valor máximo de aceite que era capaz de integrarse, y mantenerse en la emulsión, después de su desestabilización.

Con este objeto se realizó un ensayo de inversión de la emulsión. Se decidió el uso de una sola concentración de proteína, y esta fue del 8% debido a que hasta el momento está era la condición que mayor volumen de emulsión estable generaba (80 %). El ensayo consistió en generar una emulsión aceite en agua, adicionando de manera continua aceite hasta que la emulsión se invirtió a agua en aceite, en este punto fue dónde se detuvo la incorporación de aceite, y se procedió a desestabilizar la emulsión, tal y como se había venido haciendo. El valor máximo de aceite incorporado (245 mL), represento el 71% del volumen total inicial (345 mL) de emulsión, previo a su desestabilización (cuadro 9.3.4). Después de la desestabilización de la emulsión, se obtuvo 98.55% de emulsión estable y sólo un 1.45% de aceite liberado.

Cuadro 9.3.4. Inversión de la emulsión. Resultados de la desestabilización de la emulsión agua-aceite generada por el método de inversión de la emulsión aceite-agua, estabilizada con 8% (p/v) de proteína. El aceite se adicionó de manera constante y con agitación continua.

Proteína adicionada al inicio (% p/v)	Total de aceite incorporado para generar la emulsión (% v/v)	Aceite liberado después de la desestabilización de la emulsión (% v/v)	Emulsión estable después de la desestabilización (% v/v)	Relación: emulsión estable / Aceite inicialmente adicionado (v/v)	Relación: emulsión estable / Proteína inicialmente adicionado (v/p)
8	71	1.45	98.55	1 39	12 32

La figura 9.3.1 muestra las imágenes de las emulsiones desestabilizadas para 6 y 8% de proteína y donde se varió el porcentaje de aceite.

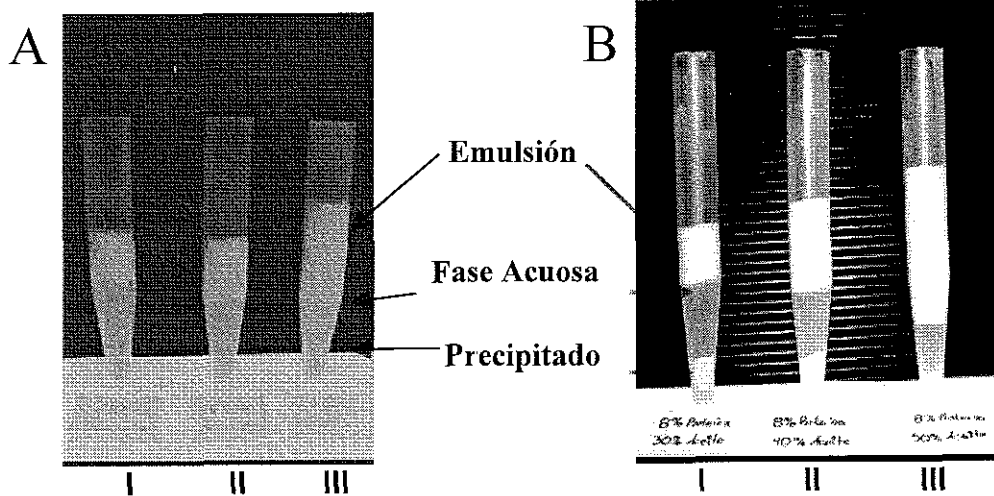


Figura 9.3.1. Emulsión desestabilizada. Imágenes de la emulsión desestabilizada donde puede observarse la presencia de tres fases; emulsión, fase acuosa y precipitado. Los porcentajes de aceite adicionado fueron de 30% (I), 40% (II) y 50% (III). A) 6% de proteína. B) 8% de proteína.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En las figuras 9.3.2, 9.3.3, 9.3.4 y 9.4.5 puede observarse el comportamiento de las distintas fracciones al modificar las proporciones de aceite y proteína adicionados en la emulsión. En todos los ensayos se observó un notable incremento en la proporción de emulsión estable, ya sea que en éstos se incrementara la proporción de aceite, o la proporción de proteína inicialmente adicionada. Los valores para la emulsión estable van desde un 36% para 6% proteína y 25% de aceite, hasta un 99% para 8% de proteína y 71% de aceite. Se observó también un descenso en la proporción tanto de la fase acuosa como del precipitado, a medida que aumentaba la proporción de emulsión estable, indicando que tanto la proteína soluble como la insoluble participan en la formación y estabilización de la emulsión. La relación *emulsión estable / aceite inicialmente adicionado* mantuvo valores relativamente constantes (entre 1.38-1.61), lo que significa que en promedio se obtiene 1.5 L de emulsión por cada 1 L de aceite, estos resultados fueron para las distintas concentraciones de proteína y volúmenes de aceite utilizados. En tanto que la relación *emulsión estable / proteína adicionada inicialmente*, aumenta al variar la concentración de aceite, siempre que éste sea suficiente para integrarse junto a la proteína, sin convertirse en el compuesto limitante para la formación de emulsión. Existe también un aumento en este índice al aumentarse la concentración de proteína. La mayor relación *emulsión estable / proteína inicialmente adicionada* es de 12.32, significando que, se generan 12 L de emulsión estable por cada 1 g de proteína, esto se observó para un 71% de aceite y un 8% de proteína.

De lo que concluimos que habiendo en el sistema suficiente aceite, la proteína del aislado de ajonjolí es capaz de incorporarlo casi en su totalidad, para dar lugar a una emulsión aceite-agua estable a la acción de la fuerza centrífuga.

No existe unificación en los métodos para medir la estabilidad de emulsiones aceite-agua, esta limitante hace difícil la comparación entre proteínas evaluadas en relación a esta capacidad (34), sin embargo es importante hacer notar que, la comparación contra el aislado de soya (concentraciones de proteína menores al 5% y 25% de aceite) mostró una capacidad emulsificante semejante a la del aislado de ajonjolí. Aunque reconocemos la importancia de una comparación mas completa tanto contra soya como contra otras proteínas consideradas buenos agentes estabilizantes de emulsiones, reconocemos también que ésta va mas allá de los objetivos del presente estudio.

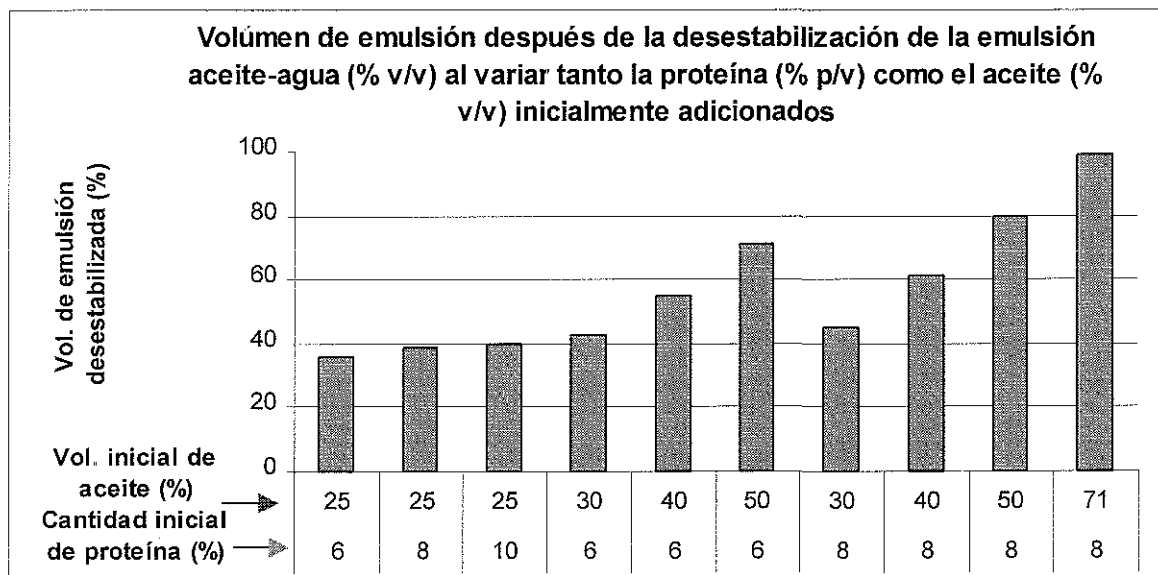


Figura 9.3.2. Volúmenes de emulsión (% v/v) después de la desestabilización de la emulsión aceite-agua al variar la concentración de proteína inicialmente adicionada (6, 8 y 10% p/v) así como el aceite inicialmente incorporado (25, 30, 40 y 50% v/v).

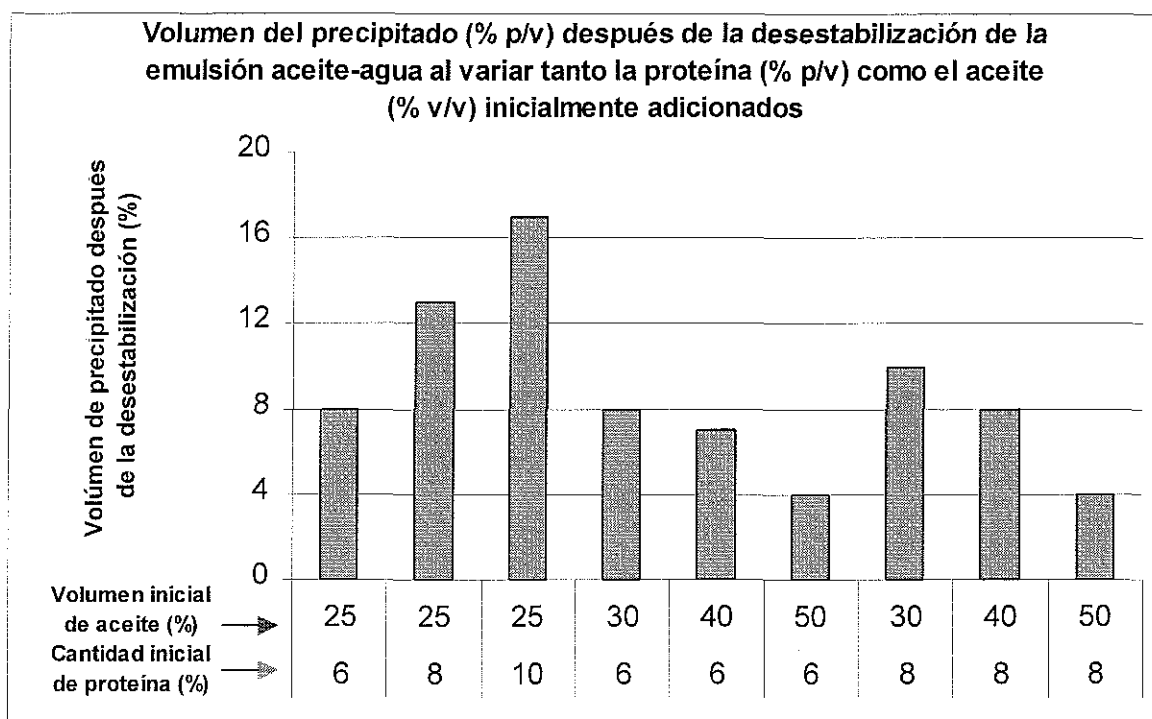


Figura 9.3.3. Volúmenes de precipitado (% p/v) después de la desestabilización de la emulsión aceite-agua al variar la concentración de proteína inicialmente adicionada (6, 8 y 10% p/v) así como el aceite inicialmente incorporado (25, 30, 40 y 50% v/v).

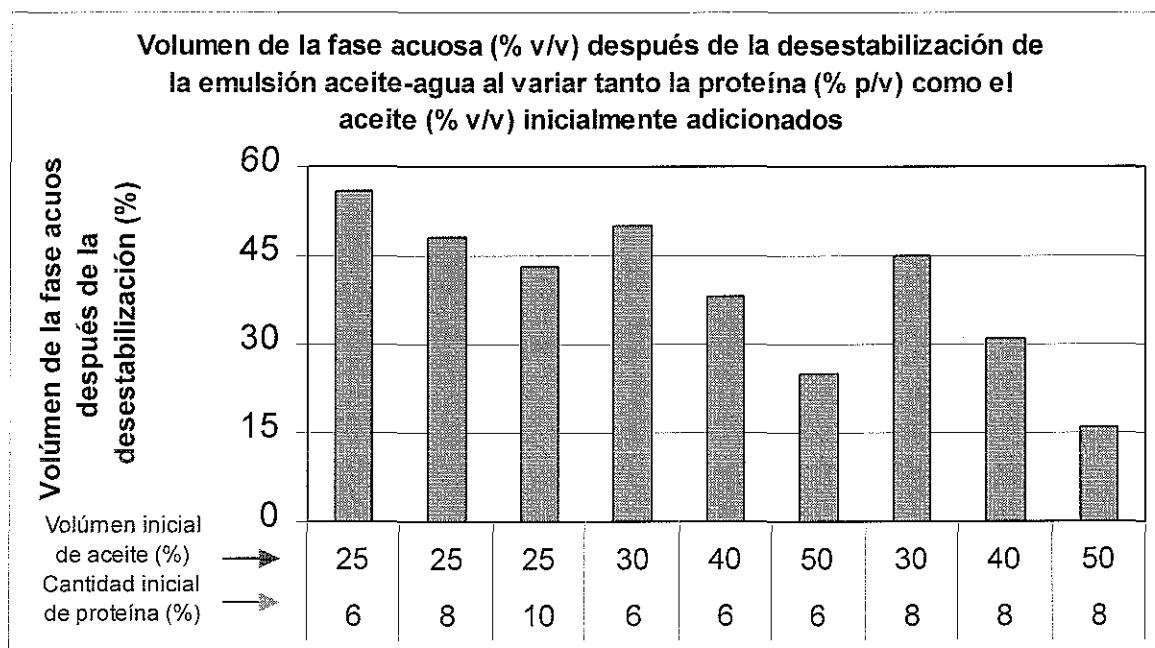


Figura 9.3.4. Volúmenes de la fase acuosa (% v/v) después de la desestabilización de la emulsión aceite-agua al variar la concentración de proteína inicialmente adicionada (6, 8 y 10% p/v) así como el aceite inicialmente incorporado (25, 30, 40 y 50% v/v).

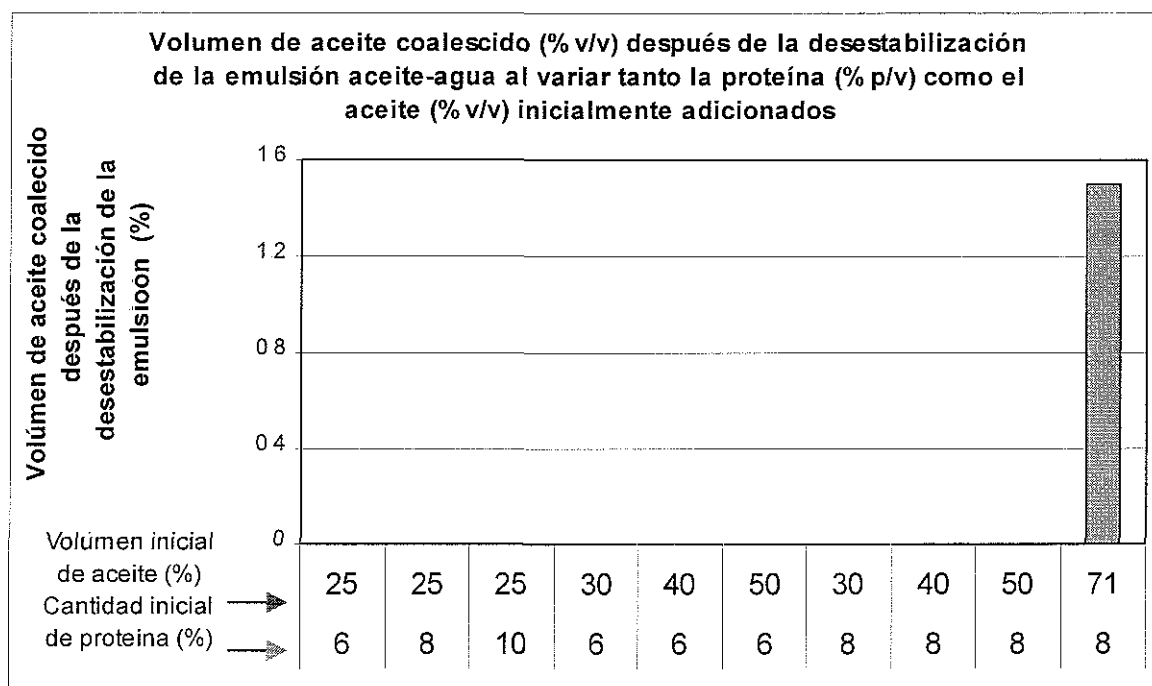


Figura 9.3.5. Volúmenes de aceite coalescido (% v/v) después de la desestabilización de la emulsión aceite-agua al variar la concentración de proteína inicialmente adicionada (6, 8 y 10% p/v) así como el aceite inicialmente incorporado (25, 30, 40 y 50% v/v).

9.4 Extracción de las proteínas de la emulsión.-

Una vez caracterizado el aislado en términos de un patrón electroforético y verificada su capacidad emulsificante, se procedió a la extracción de las proteínas de la emulsión (78), así como a la determinación electroforética de las proteínas participantes en su formación y estabilización.

La figura 9.4.1 muestra el perfil electroforético bajo condiciones desnaturalizantes de las proteínas extraídas de la emulsión. Se pueden observar un total de 13 bandas, mismas que se observan en el aislado original. Destacan el triplete de 30-35 kDa y el doblete de 20-25 kDa previamente observados en los perfiles de disolución del aislado a distintos pH. Se observó en una cantidad apreciable una banda en 55 kDa y con menor intensidad la de 50 kDa que coinciden con las pertenecientes al triplete de 50-60 kDa, antes observado (Fig. 9.2.1.1 y 9.2.1.2). Las otras bandas observadas en menor intensidad son de pesos mayor a 300, 29 y menor a 14 kDa

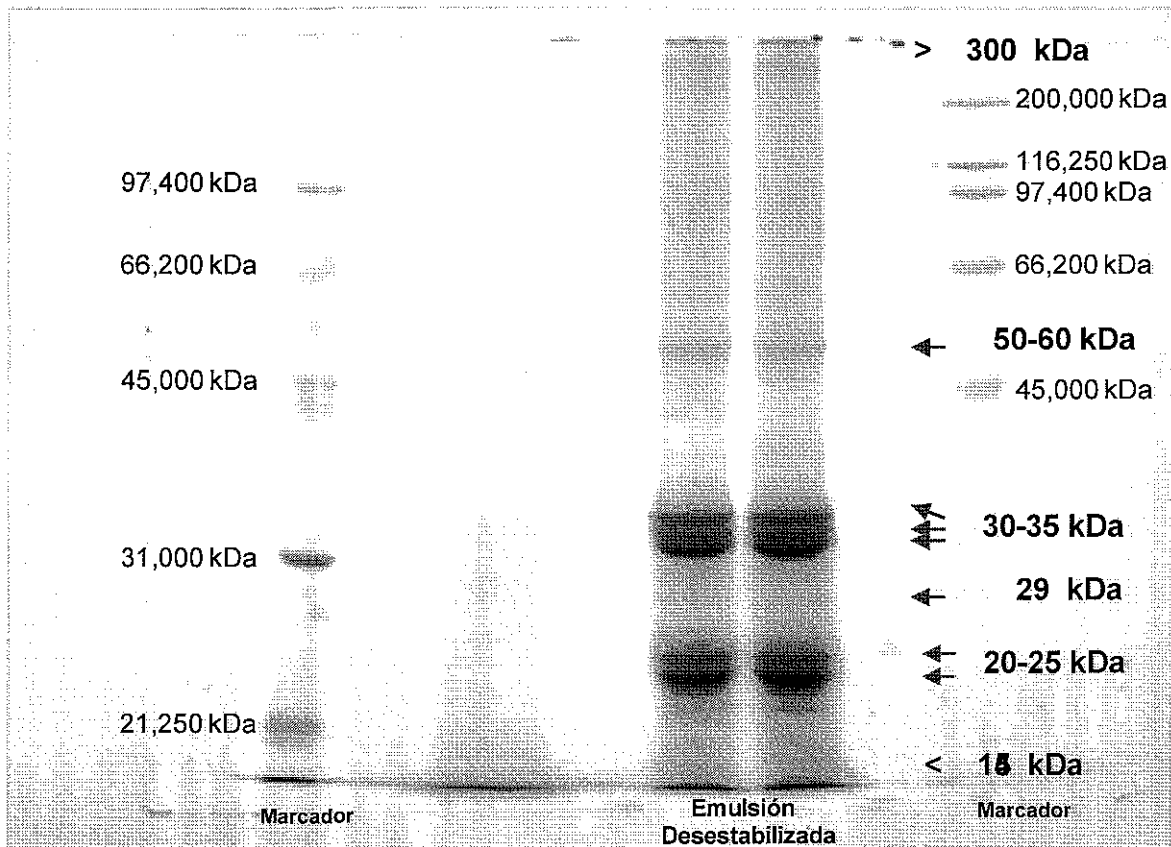


Figura 9.4.1. Emulsión desestabilizada. SDS-PAGE. Separación en gels al 16% de acrilamida

La figura 9.4.2 muestra el perfil electroforético en ausencia de β -mercaptoetanol de la emulsión desestabilizada, donde puede observarse la presencia mayoritaria del triplete de 50-60 kDa. Bajo estas condiciones se observan también en mucho menor proporción bandas en 20-25 y 30-35 kDa que concuerdan con las subunidades de las de 50-60 reportadas por otros autores y detectadas por nosotros previamente (Fig. 9.2.1.1, 9.2.1.2 y 9.4.1) y que, aparecen probablemente por una disociación parcial por efecto del calentamiento al que se sometió la muestra, tal y como se ha reportado para la β -conglucina de soya (45) y globulinas de amaranto y soya (28). También pueden observarse bandas de peso mayor a 200 kDa, así como proteína que no pasó al gel separador, seguramente por su alto peso molecular. Por último se observan bandas de 13 y 9 kDa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

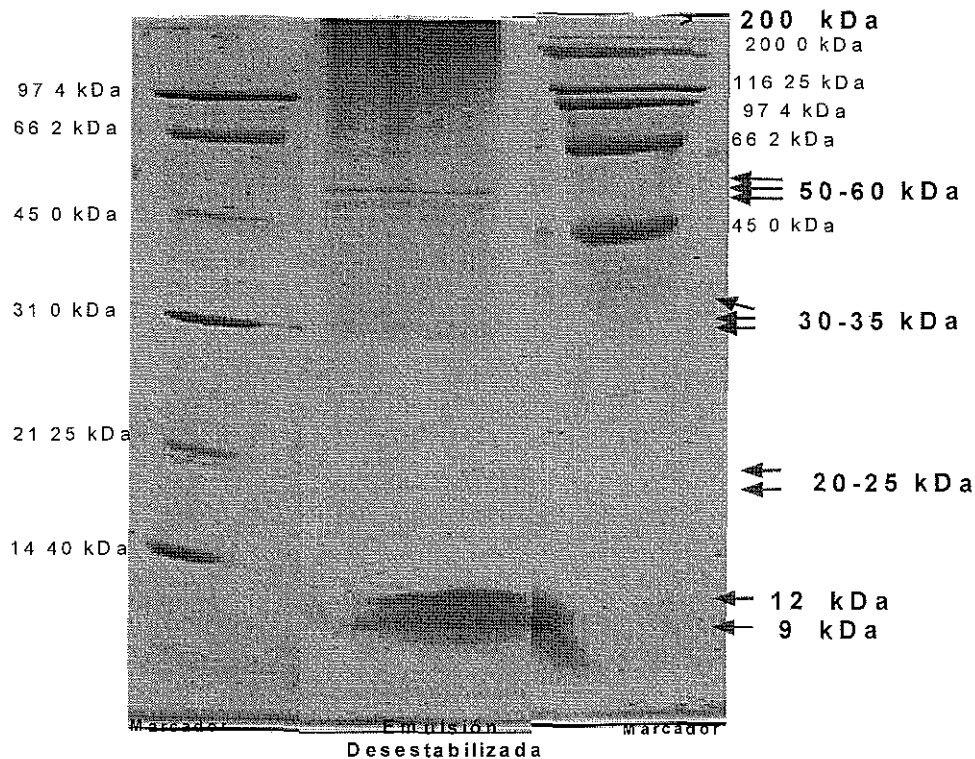


Figura 9.4.2 Emulsión desestabilizada. Perfil electroforético sin β -mercaptoetanol. Separación en geles al 12.5% de acrilamida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El perfil obtenido bajo condiciones nativas muestra una única banda de peso molecular superior a los 200 kDa. Estos resultados parecen indicar que la proteína responsable de la capacidad de formación y estabilización de emulsiones es única y de peso molecular superior a 200 kDa; además dicha proteína se disocia principalmente en un triplete de 50-60 kDa cuando se somete a la acción de un detergente capaz de romper enlaces de tipo no covalente, como el SDS, por lo que el multímero está asociado al menos parcialmente por fuerzas de tipo no covalentes. La presencia de un agente reductor disocia a su vez al triplete en otro triplete de 30-35 kDa, y en un doblete entre 20 y 25 kDa, por lo que proponemos que las proteínas de 50-60 kDa están formadas por el triplete de 30-35 kDa y el doblete de 20-25 kDa a través de uno ó varios enlaces disulfuro. Se encuentra reportado (84) que las proteínas del triplete de 50-60 kDa en ajonjolí son isoformas, que además son la unidad fundamental de este sistema de asociación-disociación, que cada una es generada

por un único gen y por último que unen a una subunidad del grupo de 20-25 kDa con otra del de 30-35 kDa, a través de un solo enlace disulfuro

También se encuentra reportado para globulinas de amaranto y soya (28), la existencia de formas intermediarias diferentes a la nativa. Las bandas de 150 y 250 kDa y otras de peso superior observadas en este trabajo, pueden ser producto de un comportamiento de asociación/disociación del multímero de 300-360 kDa, cuyos intermediarios serán múltiplos del monómero de 50-60 kDa unidos entre si, principalmente a través de interacciones no covalentes.

Cabe hacer notar que las bandas que se observan en la emulsión son también las que mayoritariamente se hallan en la fracción disuelta a diferentes pH, en particular en pH básicos.

Después de la desestabilización de la emulsión, el perfil electroforético fue igual tanto para la fracción precipitada como para la fracción disuelta, por lo que tanto las proteínas solubles como las insolubles participan en la formación y estabilización de emulsiones.

9.5 Separación de los grupos de proteínas mayoritarias.-

9.5.1 Extracción de proteínas mediante disolución en distintos disolventes.-

El perfil electroforético del aislado disuelto a diferentes pH y el de las proteínas encontradas en la emulsión comparten los mismos grupos de bandas. Con el fin de caracterizar y separar dichas bandas, en particular los tripletes de 30-35 y 50-60 kDa y el doblete de 20-25 kDa, se decidió llevar a cabo la extracción secuencial de proteínas según la clasificación de Osborne y Campbell (1914), la cual se basa en que cada grupo presentará diferencias en la disolución al variar el disolvente, de acuerdo con la naturaleza de la proteína, lo que permitirá la extracción diferencial de éstas.

El cuadro 9.5.1.1 muestra los valores obtenidos para las distintas fracciones. Como se puede observar, el rendimiento total final fue de 68.58% cuantificado por Lowry y de 55.08% cuantificado por masa. A lo largo del proceso de extracción existen múltiples pasos donde se pierde muestra y es por este motivo que los rendimientos son tan bajos. La comparación del rendimiento por pesado de las distintas fracciones se hizo para confirmar los resultados obtenidos por el método de Lowry; sin embargo, el pesado de las distintas fracciones presentó pérdidas por sí mismo. Los resultados muestran entre un 8 y 17% de proteína para las distintas fracciones, en tanto que la literatura reporta que la fracción globulina (soluble en NaCl) representa el 70% de la proteína de la semilla y la albúmina (soluble en agua) el 25% (41, 84).

En conclusión, creemos que si se hubiesen aumentado los lavados con la disolución salina o si se hubiese incrementado la proporción disolvente / proteína, el rendimiento de la fracción globulina hubiese también aumentado, así mismo en lo referente a las otras fracciones.

Cuadro 9.5.1.1 Rendimiento de la extracción secuencial de proteínas según su solubilidad en diferentes disolventes (Osborne y Campbell, 1914). Rendimientos expresados en composición porcentual y tomando como base la proteína inicial, antes de la extracción. Resultados según la determinación hecha por Lowry (60) y por pesado de las muestras extraídas.

Tipo de proteína, según su disolución en distintos disolventes (Osborne y Campbell, 1914)	Determinación por el método de Lowry (%)	Determinación por masa (%)
Albúmina	14.42	8.58
Globulina	12.55	8.03
Prolamina	11.12	6.03
Glutelina	17.35	14.97
Precip. final	13.14	17.47
Total	68.5	55.08

El perfil electroforético de las distintas fracciones extraídas se aprecia en la figura 9.5.1.1 Los perfiles de las fracciones globulina (NaCl 0.5 M), prolamina (mezcla alcohol-agua), glutelina (disolución básica) y el precipitado obtenido al final de las extracciones, son similares entre si y también con la emulsión desestabilizada. Con excepción del agua, todos los disolventes usados extrajeron los tres grupos de proteínas antes vistos (Fig. 9.2.1.1, 9.2.1.2, 9.4.1 y 9.4.2), como componentes mayoritarios de la extracción, por lo que estas proteínas deben poseer características similares de disolución. La fracción albúmina (agua), que aunque presenta el triplete de 30-35 kDa y el doblete de 20-25 kDa, lo hace con muy baja intensidad. Sabemos que de acuerdo con el disolvente utilizado las proteínas adoptaran una conformación que les permite disolverse en cierta medida. Esta técnica no permitió separar entre si a los tres grupos mayoritarios de proteínas, ni tampoco permitió la caracterización del aislado en un grupo proteínico principal, según su disolución en distintos disolventes (Osborne, 1914); sin embargo, si muestra la variedad de condiciones en las que estos tripletes pueden ser extraídos. La fracción globulina (NaCl 0.5 M) se convirtió en un precipitado altamente insoluble en agua después de extraerle el agua y la sal, por liofilización y diálisis, respectivamente, lo que indica que la disolución bajo estas condiciones modificó en alguna forma a las proteínas del aislado.

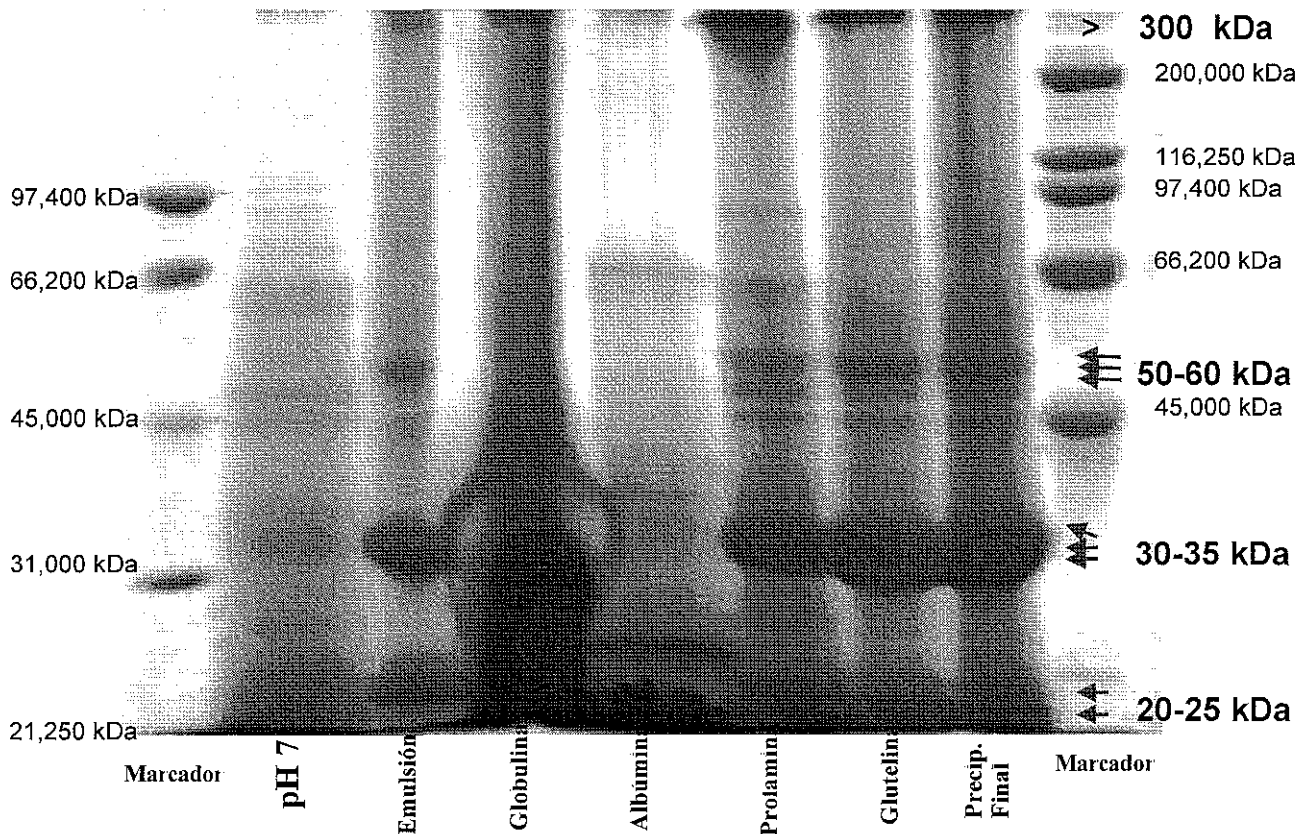


Figura 9.5.1.1 Extracción de proteínas según su disolución en diferentes disolventes. SDS-PAGE. Separado el gels al 12.5 % de acrilamida. Aislado disuelto a pH 7; emulsión desestabilizada; fracciones: albúmina, globulina, prolamina, glutelina y precipitado final.

El peso molecular del triplete (30-35 kDa) y el doblete (20-25 kDa) concuerda con los reportados para la proteína identificada como globulina 11S en ajonjolí (84). Cabe mencionar en este punto que una proteína muy similar, clasificada como tipo legumina y con el mismo nombre es reportada en distintas especies vegetales como; *Glycine max*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Lupinus albus*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Cicer arietinum*, *Phaseolus vulgaris*, *Lens culinaris*, *Arachis hypogaea*, etc. (2, 4-8, 14, 22, 28-33, 35, 38, 41, 45, 46, 50, 51, 53-55, 57, 59, 61, 72, 73, 81, 84, 87-89, 91, 92). Entre las características que comparten, además de su similitud en secuencia de aminoácidos, es que una de las bandas correspondientes a 20-25 kDa (subunidad básica) y otra correspondiente a 30-35 kDa (subunidad ácida) se asocian bajo condiciones no reductoras, formando una proteína precursora de 50-60 kDa, misma que en estado nativo se encuentra formando un hexasomero de peso molecular 300-360 kDa, entre seis unidades heterogéneas (4, 6-8, 14, 28-30, 38, 45, 46, 53-55, 57, 72, 73, 81, 84, 88-89, 91, 92). Por

lo tanto se siguió explorando el aislamiento de dichas proteínas, para lo que se probaron diferentes estrategias, algunas de ellas reportadas para la misma proteína en otras especies de plantas.

9.5.2 Separación de los grupos de proteínas mayoritarios según su coeficiente de sedimentación.-

Las diferentes evidencias mostraron a los tripletes de 50-60, 30-35 kDa y al doblete de 20-25 kDa como las proteínas principalmente responsables de las características del aislado. Por otro lado, diferentes autores reportan la extracción de globulinas de diferentes especies vegetales, a través del uso de fuerza centrífuga, en particular de centrifugación diferencial (32, 87, 91, 92).

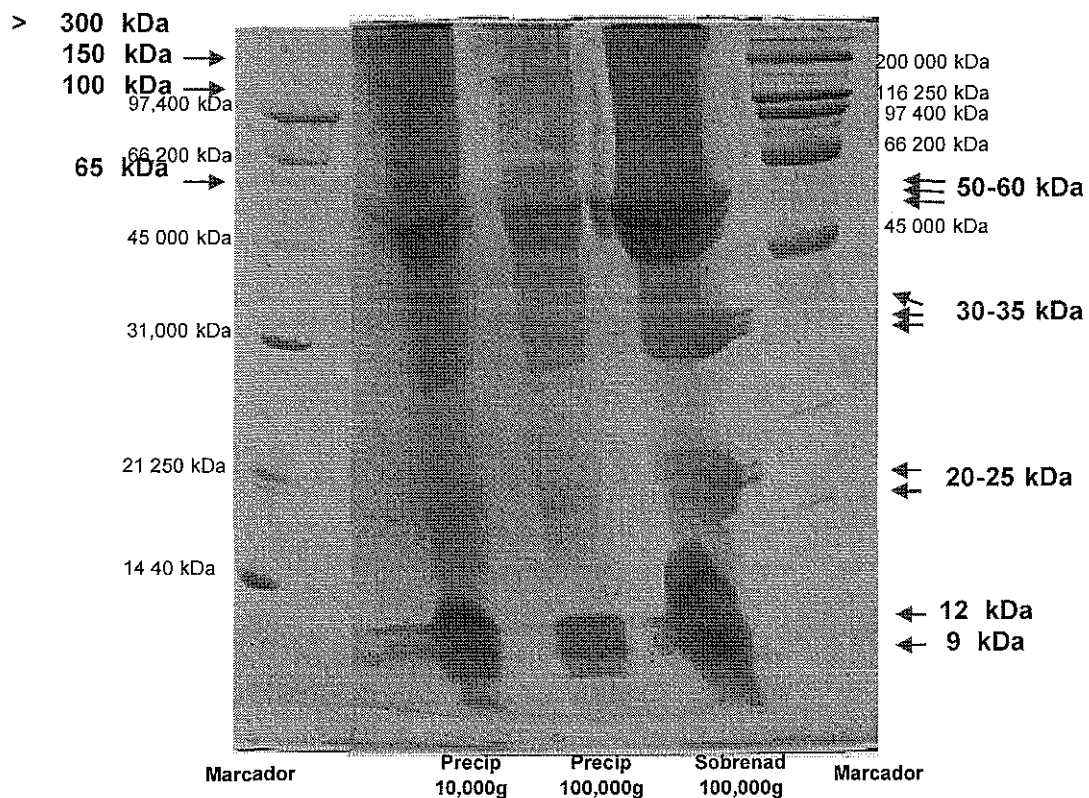


Figura 9.5.2.1 Gradiente de centrifugación. Perfil electroforético sin β -mercaptoetanol. Fracciones de la centrifugación diferencial del aislado (pH 7.5). Separación en geles al 12.5% de acrilamida. Pellet 10,000 rpm (12,100 g), pellet 34,000 rpm (100,000 g), sobrenadante 34,000 rpm (100,000g)

TI. 11. 11. 11
FALLA 11. 11. 11

Se intentó la separación de los grupos de proteínas al someter el aislado de manera sucesiva a fuerzas centrífugas de 10,000 y 100,000 g. La centrifugación diferencial del aislado (pH 7.5) no resultó en cambios en el perfil electroforético bajo condiciones no reductoras (figura 9.5.2.1) de los precipitados de las fracciones centrifugadas a 12,100 rpm (10,000 g) y 34,000 rpm (100,000 g), ni tampoco en los sobrenadantes de las mismas fracciones. El triplete de 50-60 kDa es mayoritario, se observan también el triplete de 30-35 kDa y el doblete de 20-25 kDa. En menor concentración, se logran observar la presencia de las siguientes bandas: mayor a 300, 150, 100, 74, 65 y menor a 12 kDa. La presencia del mismo perfil electroforético en todas las fracciones y en particular, de la fracción restante en el sobrenadante de la última centrifugación, lleva a pensar que el tiempo al que las fracciones se sometieron a centrifugación es la variable determinante para la precipitación de la muestra, por lo que a un tiempo mayor el triplete de 50-60 kDa precipitaría en su mayoría y no estaría presente en el sobrenadante. La disociación del triplete de 50-60 kDa en subunidades de 20-25 y 30-35 kDa pudo deberse al tratamiento térmico al que se sometió. La acción conjunta del detergente SDS, desdoblado en cierta medida la proteína y exponiendo los enlaces disulfuro, y el tiempo de ebullición, que aporta la energía térmica para la ruptura de estos enlaces, permiten la separación en sus subunidades. Se encuentra reportada (45) la ruptura del enlace disulfuro que une la subunidad ácida y la básica de la glicinina de soya por efecto de la energía térmica.

La banda de peso mayor a 300 kDa se observa en las diferentes muestras, esta parece corresponder a seis veces el múltiplo de la de 50-60 kDa. Con base en diferentes reportes hallados en la literatura para la llamada globulina 11S de diferentes especies (4, 6-8, 14, 28-30, 38, 45, 46, 50, 53-55, 57, 61, 72-74, 81, 84, 87, 89, 91, 92), creemos que la banda observada por nosotros corresponde a la asociación de seis de estos monómeros (50-60 kDa) en una estructura cuaternaria hexamérica. Se observa también la presencia de las bandas de 150 y 100 kDa, también reportadas en la literatura como asociaciones del monómero, para formar trímeros y dímeros respectivamente.

Los perfiles electroforéticos (4, 6-8, 14, 28-30, 45, 46, 50, 53, 55, 57, 61, 72-74, 81, 84, 87, 89, 91, 92) reportados para globulinas de distintas especies vegetales, muestran la presencia de una banda en el intervalo de 70-76 kDa, así como la de peso menor a 14 kDa. No hay reportes que expliquen la banda de 70-76 kDa. La hipótesis que sugerimos es que dicha banda es

producto de la disociación y reasociación de algún intermediario del hexámero (300-360 kDa), mismo que podría ser, una subunidad del doblete de 20-25 kDa, asociada a la de 50-60 kDa, o la asociación de esta molécula de 50-60 kDa junto a la de peso menor a 14 kDa. Sea cual sea el mecanismo, esta banda no se puede observar en presencia del agente reductor, por lo que en su formación participan enlaces disulfuro.

Existen dos reportes referentes a la albúmina 2S de ajonjolí, cuyo peso bajo condiciones no reductoras se halla entre 13 y 14 kDa (59, 84), ambos presentan diferentes secuencias de aminoácidos. La comparación entre estas dos secuencias (Anexo V) no muestra similitud entre ellas. Por tanto, se propone que la llamada albúmina 2S corresponde a más de un péptido y se piensa también que al menos uno de ellos, se asoció y disoció a partir de algún intermediario de la globulina 11S, inducido por cambios en la fuerza iónica o pH del sistema y que, cambios en los mismos factores provocan la disociación de dicho intermediario.

La ultracentrifugación diferencial no permitió separar a los diferentes componentes del aislado ni de la emulsión desestabilizada. Por otro lado, los distintos componentes tanto del aislado como de la emulsión no pudieron separarse con base en un coeficiente de sedimentación. Es probable que el uso de fuerzas centrífugas mayores, tiempos de centrifugación más largos o el aumento de la viscosidad del medio permitiesen una separación entre los componentes de alto y bajo peso molecular. Se encontró reportado (22) que la centrifugación diferencial de globulinas permite sólo un grado parcial de separación de las distintas fracciones, por lo que se decidió no seguir experimentando con esta técnica.

Ni la extracción secuencial, ni la centrifugación diferencial permitieron la separación de los grupos de proteínas. Tanto en condiciones desnaturalizantes, como en ausencia del agente reductor, mostraron en todos los ensayos a los tres grupos principales (20-25, 30-35 y 50-60 kDa), así como al grupo de peso menor a 14 kDa.

Los perfiles en ausencia del agente reductor mostraron las bandas de pesos moleculares superiores: 300, 150, 100, 74 y 65 kDa, confirmando su existencia por efecto de enlaces disulfuro entre subunidades de pesos menores.

9.5.3 Separación de grupos de proteínas mediante ultrafiltración.-

Con el fin de separar las proteínas de peso molecular menor a 50 kDa, de las de peso superior, se realizó un proceso de ultrafiltración. Para este fin se utilizó una membrana con límite de exclusión de 50,000 Da (YM 50). La muestra utilizada fue la emulsión desestabilizada disuelta con tris-HCl 1.5 M, pH 6.8.

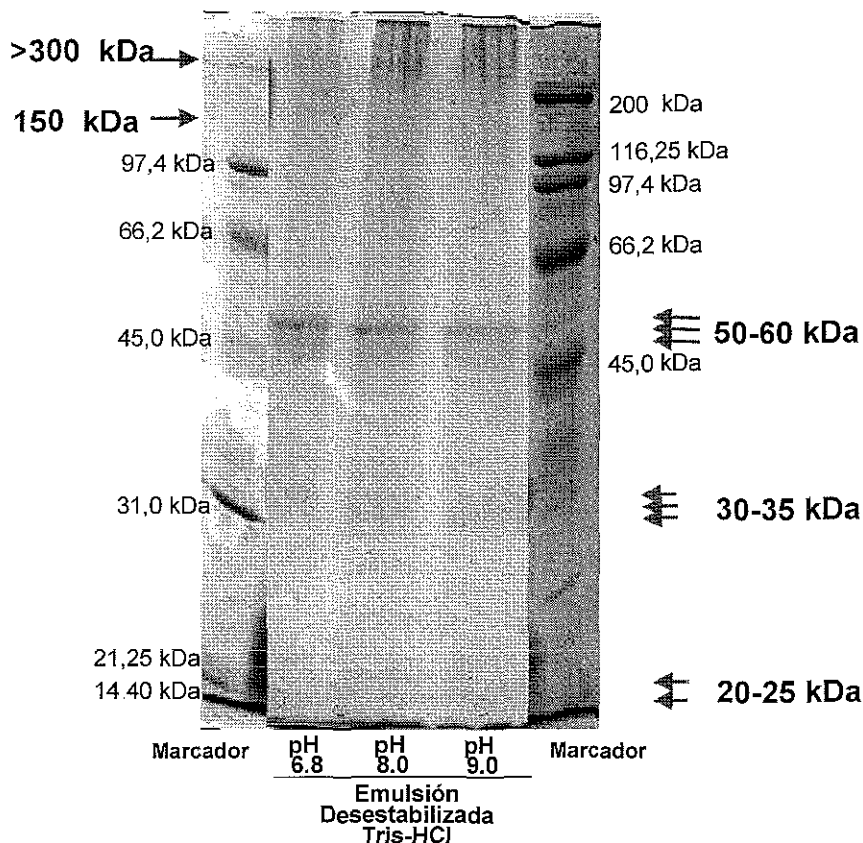


Figura 9.5.3.1 Ultrafiltración Perfil electroforético sin β -mercaptoetanol antes de ultrafiltrarse. Emulsión desestabilizada disuelta con tris-HCl 1.5 M, pH 6.8, 8 y 9. Separación en geles al 10% de acrilamida. Gel concentrador 3 M urea.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el perfil electroforético de la muestra antes de ultrafiltrarse y en ausencia de β -mercaptoetanol (Figura 9.5.3.1), se observaban el grupo 50-60 kDa, los grupos de 30-35 kDa y 20-25 kDa, así como la banda de 150 kDa y la mayor a 300 kDa. La figura 9.5.3.2 muestra el perfil electroforético después de la ultrafiltración, tanto de la fracción retenida como de la que la traspasó. En la fracción retenida deberían haber aparecido bandas de

peso molecular superior a 50 kDa, sin embargo, únicamente se observan la banda de peso mayor a 300 kDa y una por debajo de los 14 kDa. La fracción correspondiente al sobrenadante, que debería contener proteínas de pesos menores a 50 kDa, presentó la banda de 60 kDa así como la mayor a 300 kDa.

La presencia de proteína por debajo de los 14 kDa en el retenido (PM>50 kDa) permite suponer que es producto de la disociación de la de 300 kDa, la de 50-60 kDa o algún intermediario. La presencia de proteína en el sobrenadante (PM<50 kDa), con peso molecular de 60 y 300 kDa, apoya la posibilidad de una reasociación de las proteínas de bajo peso en las de alto peso observadas.

Estos resultados confirman algún tipo de mecanismo de disociación-asociación de las distintas formas de esta proteína, que en este caso ocurrieron después de su filtración. Evidentemente la ultrafiltración no sirvió como método para separar los distintos grupos de proteínas, por lo que se descartó en actividades subsecuentes.

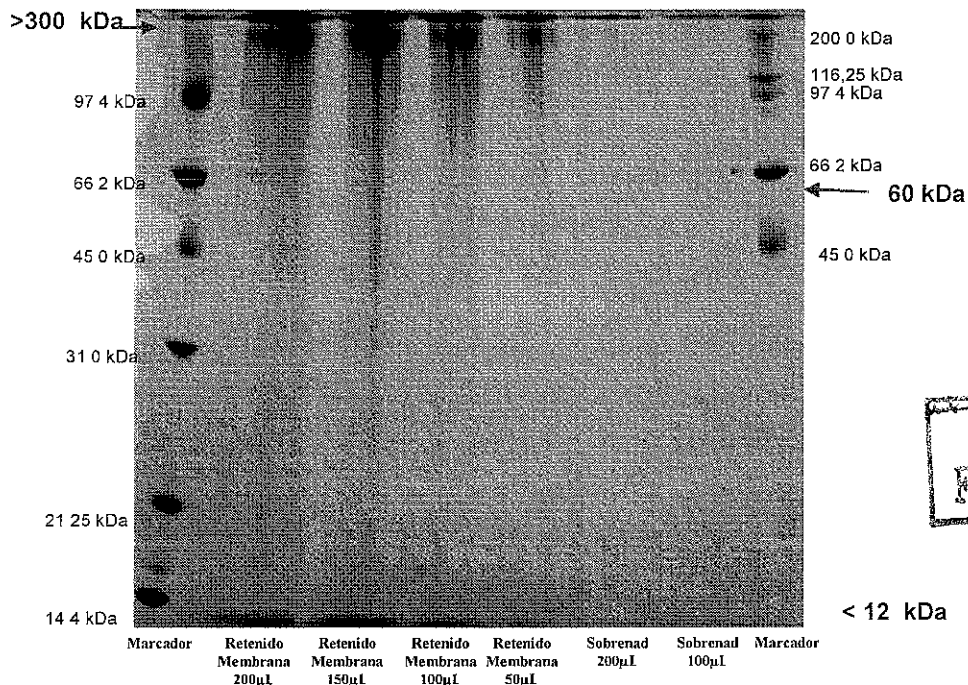


Figura 9.5.3.2 Ultrafiltración. Perfil electroforético sin β-mercaptoetanol después de ultrafiltrarse. Ultrafiltración con equipo Amicon (YM 50), límite exclusión 50,000 kDa. Separación en geles al 12.5% de acrilamida. Geles separador y concentrador adicionados con urea 5 M. Emulsión desestabilizada disuelta con tris- HCl 1.5 M, pH 6.8, sobrenadante y retenido por la membrana. El retenido se separa de la membrana por lavados con 1 mL de urea 5 M.

9.5.4 Separación de los grupos de proteínas mediante electroelución.-

Con el propósito de purificar las bandas del triplete 50-60 kDa se realizaron geles de acrilamida preparativos para electroeluir las bandas individuales. En general los geles no corrieron bien y no hubo buena definición de las bandas individuales, sin embargo se cortaron las bandas correspondientes al trímero de interés de los distintos geles. En ninguno de los ensayos fue posible disectar con bisturí las bandas individuales del triplete de 50-60 kDa, debido a la cercanía física entre ellas. La electroforesis no-reductora de los eluidos, además de mostrar 2 ó 3 de las bandas del triplete de interés (figura 9.5.4.1), mostró también las bandas de peso menor a 14 kDa que habían venido apareciendo en distintos geles (9.2.1.1, 9.4.1, 9.4.2, 9.5.2.1 y 9.5.3.2).

La presencia de proteína de peso molecular por debajo de 14 kDa refuerza la hipótesis sobre la posible disociación de una proteína de peso superior, que probablemente pertenezca al triplete de 50-60 kDa y que se disocia como consecuencia de la fuerza iónica, pH, detergentes o una combinación de estos factores

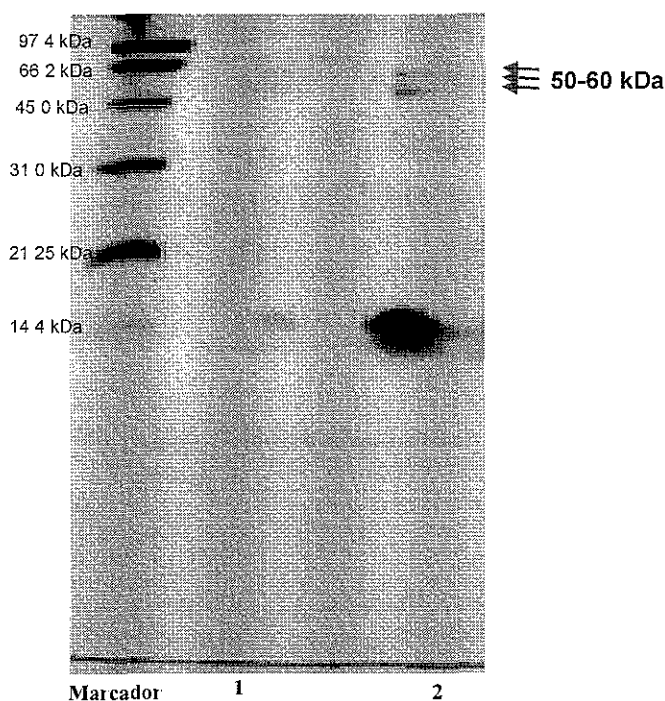


Figura 9.5.4.1 Electroelución. Perfil electroforético sin β -mercaptoetanol. Bandas electroeluidas de dos diferentes geles preparativos. Separación en geles al 17% de acrilamida. Aislado proteínico disuelto con 1.7 M NaCl.

9.5.5 Separación diferencial de globulinas.-

Algunos autores reportan la extracción secuencial de fracciones de globulinas como un medio de separar la 11S de las otras globulinas (4, 5, 6, 57, 93). La extracción consiste en lavados con agua precedidos por centrifugación para extraer la fracción albúmina; al precipitado remanente se le realizan lavados con disolución salina diluida, 0.34 M NaCl (fuerza iónica de 0.34) y centrifugación para extraer las fracciones correspondientes a globulinas 2 y 5S. Por último, al precipitado remanente se le realizan lavados con disolución salina concentrada, 1.7 M NaCl (fuerza iónica = 1.7) y centrifugación para obtener la fracción globulina 11S. La concentración de las distintas fracciones fue determinada por el método de Lowry. El cuadro 9.5.5.1 muestra las concentraciones de las fracciones y el rendimiento de la extracción.

Cuadro 9.5.5.1. Extracción secuencial de globulinas. Concentración, masa y rendimiento, obtenidos de las fracciones de los lavados secuenciales del aislado proteínico con distintas fuerza iónica.

Fracción	Globulina	Concentración [mg/mL]	Masa g	Rendimiento %
0.34 M NaCl	2, 5 S	3.640	2.32	9.28
1.7 M NaCl	11 S	5.78	3.69	14.76

Como se observa en el cuadro 9.5.5.1, la extracción con una fuerza iónica superior (1.7) permite extraer mayor concentración de proteína, la cual corresponde a casi el 15% de rendimiento, mientras para la extracción con fuerza iónica inferior (0.34) se obtiene un rendimiento en la extracción del orden del 9%. El rendimiento de la extracción con ambas fuerzas iónicas equivale al 24.04%. Es posible que una mayor proporción disolvente / aislado proteínico, así como tiempos de disolución más largos, hubieran incrementado los rendimientos. Se debe considerar que los múltiples pasos que esta técnica lleva asociados, causan la pérdida de gran proporción de muestra, en varios puntos de la misma.

Se logró la disolución del aislado tanto con fuerza iónica de 0.34 como de 1.7, el fenómeno ocurrido en ambos casos fue el conocido como salting-in, surgido como consecuencia de la disminución en el número de las interacciones hidrofóbicas entre las

moléculas proteínicas, a la vez que ocurre un aumento en el número de interacciones entre las proteínas y el disolvente.

La extracción secuencial de fracciones de globulina no sirvió como método de separación de las diferentes globulinas, ya que ambas fracciones muestran el mismo perfil electroforético (figura 9.5.5.1). Sin embargo sí permitió (bajo condiciones no reductoras) la separación del triplete de 50-60 kDa y la proteína por debajo de 14 kDa como componentes mayoritarios en ambas fracciones. Como se había observado en geles previos (9.2.1.1, 9.2.1.2, 9.4.1, 9.4.2, 9.5.1.1, 9.5.2.1 y 9.5.3.1), se distingue también la presencia del triplete de 30-35 kDa y del doblete de 20-25 kDa. Igualmente es probable que la ruptura parcial del enlace disulfuro se debiera a la energía térmica proporcionada durante la ebullición y reforzada tanto por la presencia del detergente SDS que contribuyó al desdoblamiento de la cadena, exponiendo los enlaces disulfuro presentes, como por la tensión que estos mismos sufren por la presencia de los iones Na^+ y Cl^- , que al unir a las cargas de signo opuesto de los aminoácidos cargados a ese pH, generaron fuertes repulsiones entre la misma cadena polipeptídica, causando entre otras cosas tensión de los enlaces disulfuro.

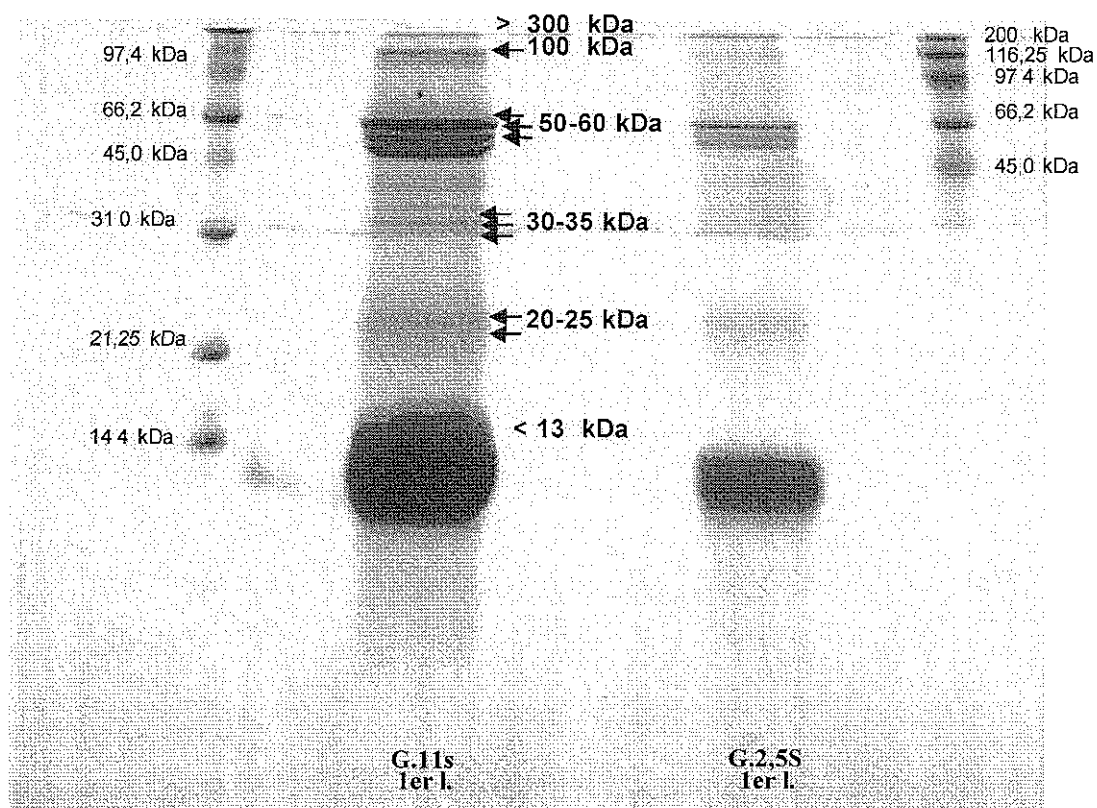


Figura 9.5.5.1. Extracción secuencial de globulinas. Perfil electroforético sin β -mercaptoetanol. Fracciones de la extracción secuencial de globulinas. Separadas en geles al 20% de acrilamida. G11S 1er lavado extracción globulinas con 1.7 M NaCl (G11S 1er l); G2,5S 1er lavado con 0.34 M NaCl (G2,5S 1er l).

TELIS CON
FALLA DE ORIGEN

La abundancia del grupo de peso menor a 14 kDa es probablemente debida, a la presencia del detergente y/o a la fuerza iónica aplicada, condiciones ambas, que debieron ser capaces de romper los enlaces débiles que unían esta proteína con alguna otra. Es de notar también la presencia de las bandas de peso molecular de 100 kDa y mayor a 300 kDa, mismas que proponemos son producto de la formación de enlaces disulfuro entre proteínas de pesos diferentes, entre las que podrían encontrarse los grupos de peso molecular menor a 14, 20-25, 30-35 y 50-60 kDa. Asimismo se observó una banda de peso molecular 44 kDa, probablemente también dissociada de alguna otra de peso mayor, por efecto de la fuerza iónica o del detergente.

A temperatura ambiente y pH 7.6, la glicinina de soya se encuentra principalmente en forma de hexámero, mientras que a pH 3.8 está presente principalmente como trímero (45).

La fuerza iónica influye en la estructura y agregación de esta misma proteína debido en parte al efecto de la sal en la disociación del trímero (53). Como previamente se refirió, es posible que las bandas observadas para el aislado de ajonjolí sean el producto de un fenómeno de disociación-reasociación similar al de las globulinas de soya, donde las bandas de pesos altos (300-350, 250, 200-220, 150, 100-120 kDa) corresponderán a múltiplos del trímero de 50-60 kDa considerado en soya como el monómero o unidad fundamental. Los resultados referentes a las proteínas de ajonjolí, parecen indicar que las interacciones de tipo electrostático tanto entre los monómeros como entre los multímeros, desempeñaran un rol muy importante en la estabilidad de los mismos, y por tanto en su comportamiento de disolución.

De nuevo, y de forma abundante se observa la presencia de la banda de peso menor a 14 kDa. Para verificar la posibilidad de que fuesen productos de degradación por la acción de proteasas, se decidió descartar su presencia.

9.6 Desestimación del efecto de actividad proteolítica.-

Para verificar que las bandas de pesos moleculares menores a a 1no fueran el producto de la degradación de proteínas por efecto de proteasas, se realizaron pruebas incubando la muestra en presencia de inhibidores de proteasas. ✓

El paso de centrifugación se realizó con el propósito de eliminar los multímeros y proteínas de alto peso molecular. La técnica de ultrafiltración se utilizó para eliminar el grupo de péptidos de peso menor a 14 kDa. Se utilizó una mezcla de inhibidores de proteasas que afecta la actividad de distintas proteasas comúnmente encontradas en semillas y extractos vegetales, incluidas proteasas de cisteína, como la asparaginil endopeptidasa encontrada comúnmente en cuerpos proteicos (38, 54). Al final se realizó una nueva ultrafiltración para eliminar posibles productos de degradación por proteasas que pudieron generarse en el tiempo que transcurrió entre la ultrafiltración y la adición del cocktail de inhibidores. El SDS-PAGE (figura 9.6.1) muestra además del triplete de 50-60 kDa, la banda de peso menor a 14 kDa.

La banda de peso molecular menor a 14 kDa observada en este ensayo, no parece ser producto de una degradación proteolítica ocurrida durante el tiempo en que este ensayo duro, al menos por la acción del grupo de proteasas inhibidas por la mezcla de inhibidores usada. Aunque no se descarta la posibilidad de que sea producto de alguna proteasa no incluida en el grupo de inhibición de la mezcla de inhibidores usada; la hipótesis que proponemos es que es producto de la disociación de una proteína de mayor peso; probablemente de la de 50-60 kDa; y cuyo origen sí pudo ser por acción de proteasas en algún otro momento de la obtención o manipulación del aislado, o quizás por la hidrólisis parcial de alguna proteína también durante la elaboración o manipulación del mismo aislado. Sea producto de hidrólisis, proteolisis o sea una proteína individual, el péptido se hallará unido a algún intermediario por interacciones débiles capaces de ser rotas ya sea por la fuerza iónica con la que se trato a la proteína o por la presencia de detergente.

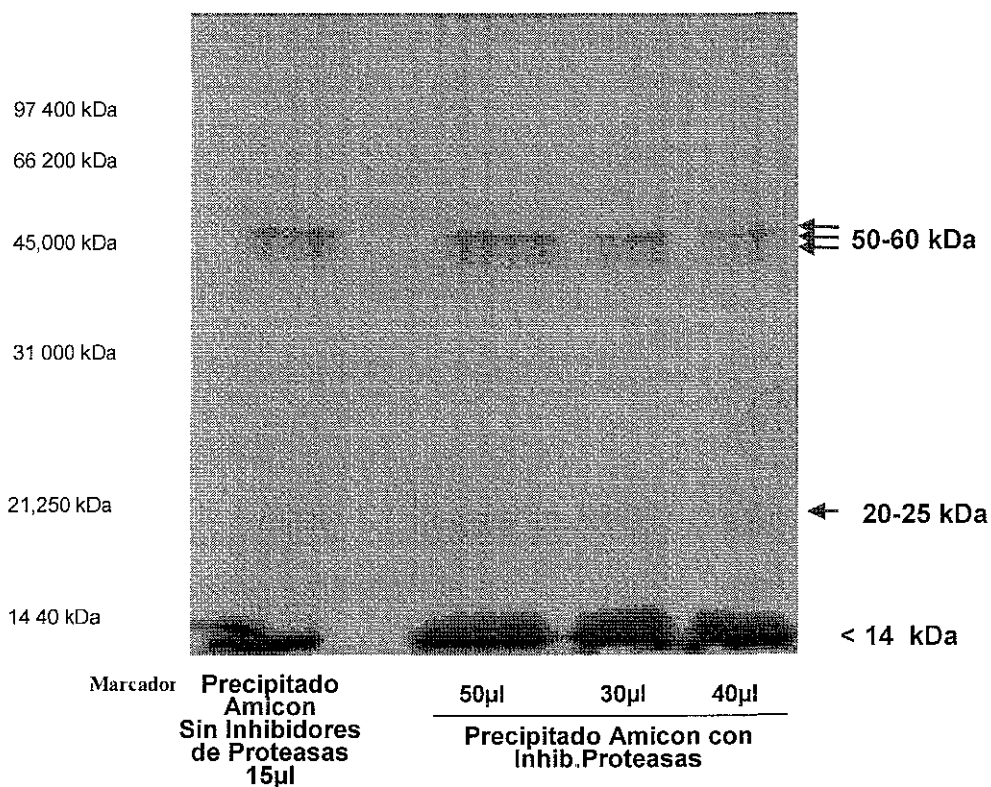


Figura 9.6.1. Efecto de inhibidores de proteasas. SDS-PAGE. Separación en gels al 12% de acrilamida. Aislado disuelto con 0.34 M NaCl. Precipitado retenido por la membrana antes y después del empleo de la mezcla de inhibidores de proteasas.

Cabe hacer notar que el proceso de obtención del aislado proteínico bajo estudio requiere de condiciones de temperatura y pH extremos donde la actividad de las enzimas proteolíticas normalmente encontradas en semillas y extractos vegetales, será poco probable.

9.7 Efecto de algunos agentes químicos sobre la disolución de la proteína.-

9.7.1 Efecto del agente reductor β -mercaptoetanol.-

El agente reductor β -mercaptoetanol actúa sobre los enlaces disulfuro de la cistina (cys-s~s-cys), reduciendo la molécula a dos cisteínas, con la correspondiente ruptura del enlace disulfuro, es por eso que, el uso de este agente, permite determinar la presencia de enlaces disulfuro en las proteínas. El tratamiento de las muestras con el agente reductor β -mercaptoetanol, a temperatura de ebullición y en presencia de SDS, permitió la disolución del precipitado en gran medida, pese a que, al retornar a temperatura ambiente se observó la presencia de partículas floculando en el medio. Por otro lado, el aislado se sometió a calentamiento (78 °C, 40 min) sin β -mercaptoetanol sin observarse mejoras en su solubilidad. La disolución de las muestras parece ser efecto del β -mercaptoetanol y no de la temperatura a la que se sometieron. La disolución de la muestra en presencia del β -mercaptoetanol significa que al menos en parte, la insolubilidad de la muestra se debe a la presencia de puentes disulfuro. Se halla reportado (28) que en la formación de los agregados de globulinas de soya intervienen, al menos parcialmente, enlaces disulfuro, producto de reacciones de intercambio.

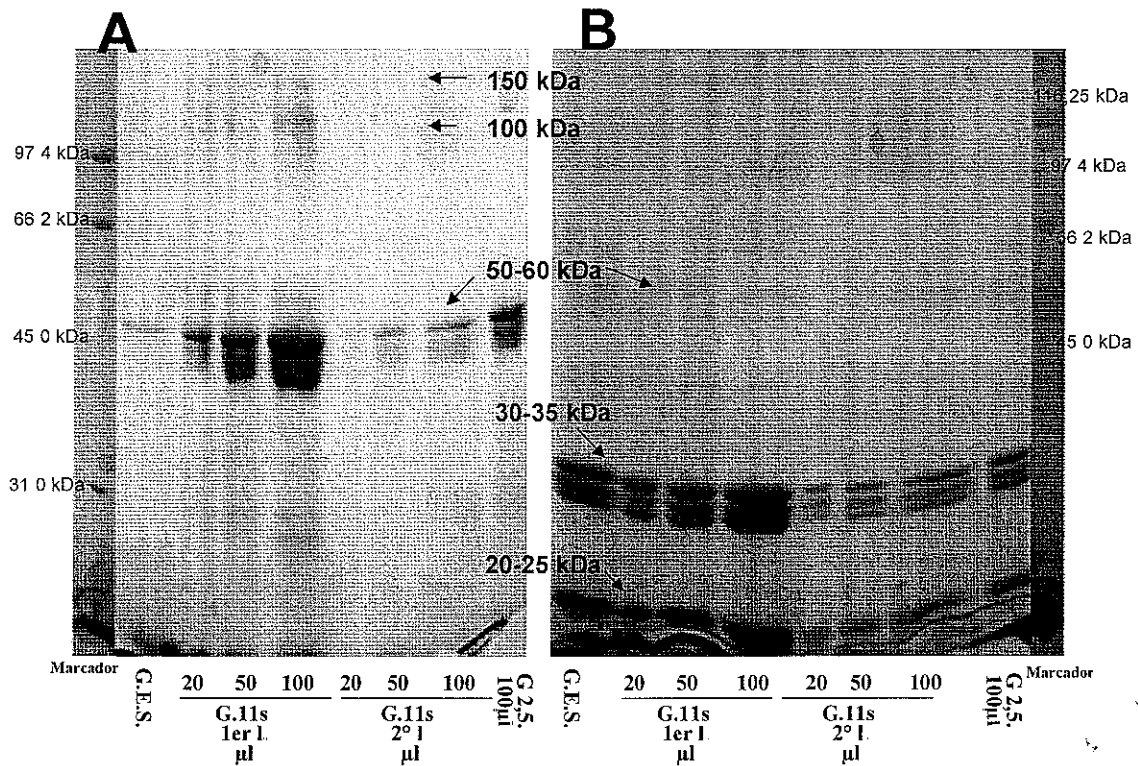


Figura 9.7.1.1 Efecto agente reductor. Perfil electroforético A) sin β -mercaptoetanol y B) con β -mercaptoetanol. Separación en geles al 12.5% de acrilamida. Muestras evaluadas: fracción globulina de extracción secuencial de proteínas (G.E.S); fracciones extracción secuencial globulinas. G11S 1er y 2º lavado con 1.7 M NaCl (G11S 1er l, G11S 2º l); G2,5S 1er lavado con 0.34 M NaCl (G2,5S).

La figura 9.7.1.1 muestra el perfil electroforético de las muestras disueltas a diferente pH, tanto en presencia como en ausencia de β -mercaptoetanol. Se puede observar la mayor abundancia del triplete de 50-60 kDa en las muestras no sometidas a la acción del β -mercaptoetanol. Por otro lado la presencia de las bandas de 20-25 y 30-35 kDa es más abundante en las muestras tratadas con β -mercaptoetanol. Sin embargo tanto éstas como el grupo de 50-60 kDa son poco notables en la muestra disuelta a pH de 5, 6 y 7, intervalo de pH donde se halla el punto de menor solubilidad del aislado.

Tanto en presencia como en ausencia de β -mercaptoetanol, se observa la presencia de las bandas de peso molecular 100, 150, y mayor a 300 kDa, sin embargo en presencia de β -mercaptoetanol son mucho menos intensas.

El tratamiento térmico (78 °C, 40 min) de la preparación en ausencia de β -mercaptoetanol muestra la presencia de las bandas de 100, 150, 250 y mayores a 300 kDa (Figura 9.7.1.2) por lo que descartamos que este tratamiento sea el causante de la desaparición parcial de las mismas, cuando se combinan ebullición y β -mercaptoetanol. Las proteínas completamente desnaturalizadas presentarán una mayor tendencia a agregarse, debido al incremento de la hidrofobicidad superficial. Como consecuencia, las globulinas 11 y 7 S de soya (2) y amaranto (20) desnaturalizadas por calor son la fracción predominante de la fracción insoluble. El tratamiento térmico efectuado al aislado de ajonjolí no contribuyó a la mejora de su solubilidad, probablemente por la misma causa.

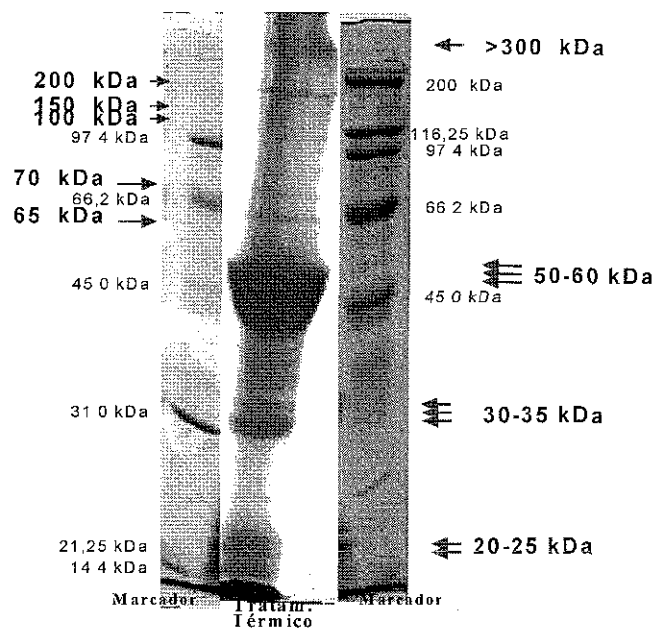


Figura 9.7.1.2 Efecto del tratamiento térmico. Perfil electroforético sin β -mercaptoetanol. Separación en geles al 10% de acrilamida. Aislado disuelto en H₂O desionizada y sometido a calentamiento (78 °C) con agitación continua durante 40 min.

Diferentes experimentos en este estudio sugieren que la aparición parcial de las bandas de 20-25 y 30-35 kDa en las muestras sin β -mercaptoetanol, será favorecida por la acción conjunta del pH del sistema y de la temperatura y tiempo de ebullición de las muestras.

La aparición de los grupos de bandas de 30-35 kDa y 20-25 kDa (Figura 9.7.1.1) en presencia del agente reductor β -mercaptoetanol firmemente sugiere que éstas se encuentran unidas por enlaces disulfuro entre ellas, dando origen al grupo de 50-60 kDa. La disminución en la concentración de las bandas de 100, 150 y mayor a 300 kDa en presencia de β -mercaptoetanol puede deberse a la acción del β -mercaptoetanol y/o al SDS, aunque la energía aportada por la ebullición pudo contribuir, al ayudar a exponer los enlaces disulfuro para la posterior acción del β -mercaptoetanol. El efecto del SDS se discute más adelante.

Proponemos que la formación de la proteína de 50-60 kDa es entre los grupos de 20-25 y 30-35 kDa, y que probablemente las bandas de 100 y 150 kDa sea entre el grupo de 50-60 kDa y el mismo.

Los grupos de proteínas (multímeros) de peso molecular mayor a 100 kDa están asociados en alguna medida por enlaces disulfuro. La determinación del tipo de fuerzas que unen a los monómeros (50-60 kDa) requerirá de estudios más detallados. Se halla reportado (50) que, en la formación de las especies multiméricas de peso molecular menor a 400 kDa en globulinas de amaranto, participan reacciones de intercambio de puentes disulfuro. Se reporta el mismo mecanismo para diferentes especies poliméricas en globulinas de soya (7) y amaranto (28)

9.7.2 Efecto del detergente SDS.-

Para determinar el efecto del detergente aniónico SDS, se utilizó la muestra extraída con NaCl 0.34, pH 6.74 y se determinaron los perfiles electroforéticos bajo condiciones nativas. Cabe aclarar que el empleo de geles nativos permite una diferenciación cualitativa de las distintas bandas y, sobre todo, la visualización de las mismas en su estado menos disociado, sin embargo, como método para determinar pesos moleculares es muy deficiente, ya que al no existir la presencia de un detergente que desdoble la molécula e iguale las cargas, así como de un agente reductor que termine de desdoblar a la molécula, ésta migrará en su forma globular nativa y por tanto su migración no sólo dependerá de su peso, sino también de su forma, siendo así que el corrimiento dependerá del radio de Stokes que

posean, mismo que será menor, y por tanto más rápido su movimiento, en moléculas globulares que en aquéllas desdobladas.

La incubación con SDS (figura 9.7.2.1) se realizó a diferentes concentraciones de detergente (0 a 0.5 M) y durante diferentes tiempos (0–96 h). En 0 M de SDS y a los diferentes tiempos, puede observarse la presencia mayoritaria de dos bandas, una aparentemente por encima de los 300 kDa y la otra cercana a la miosina (200 kDa) del marcador de peso molecular. Al aumentar la concentración de SDS se puede observar la disminución en la intensidad de la banda de peso aparente mayor a 300 kDa y el aumento en intensidad de la de peso aparente 200 kDa; así mismo, se observa la presencia de otras dos bandas en las zonas aparentemente correspondientes a 100 kDa y 70 kDa. No se aprecian cambios en los perfiles para cada una de las concentraciones de SDS durante la primera hora de incubación con el detergente; sin embargo, después de 96 horas puede observarse más claramente la disminución en la intensidad de la banda de peso aparente mayor a 300 kDa y el aumento en la intensidad de las bandas de pesos aparentes de 100 kDa y 70 kDa, así como la aparición de una banda intensa con peso aparente de 51 kDa. Es en este momento cuando es más claro el incremento en la banda de peso aparente 200 kDa (cercana a la miosina) conforme aumenta la concentración de SDS.

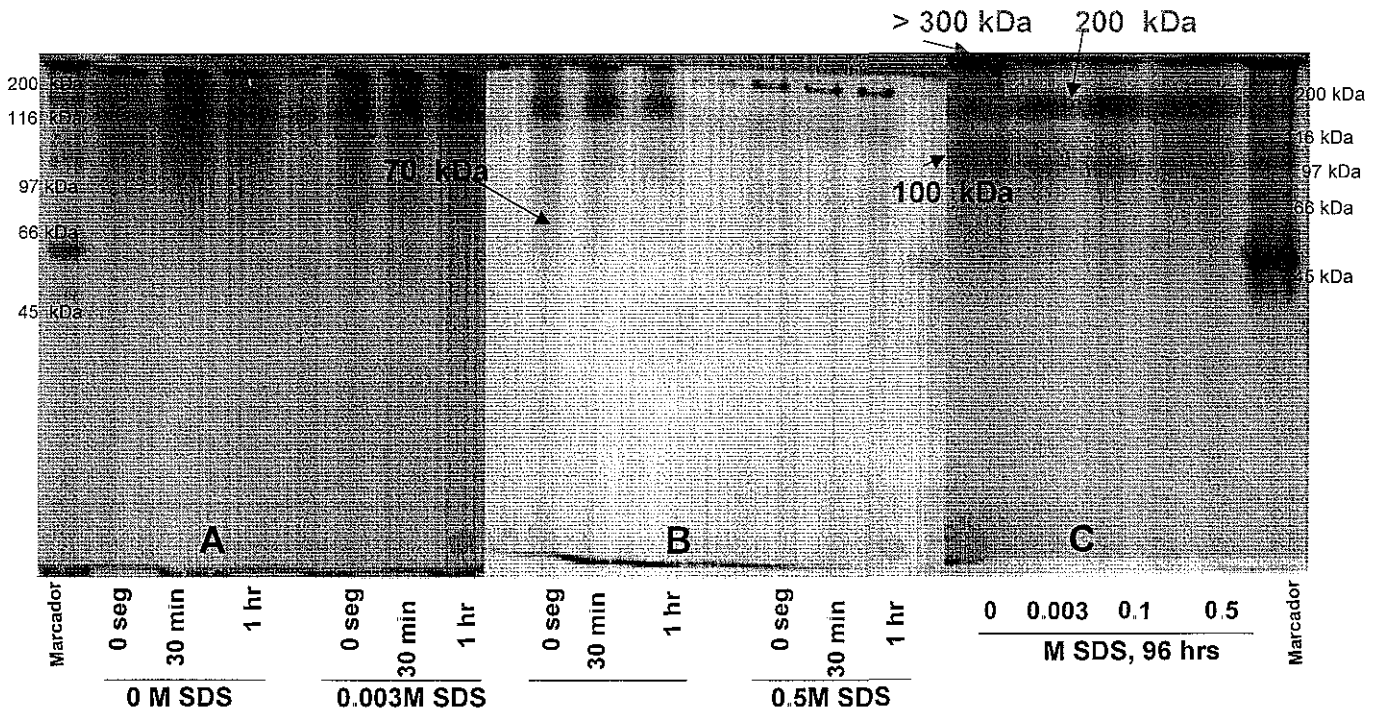
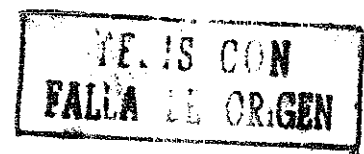


Figura 9.7.2.1. Efecto del SDS. Electroforesis nativa. Separación en gels al 12% de acrilamida. Aislado disuelto con 0.34 M NaCl; centrifugado (10,000 rpm, 12 min) y ultrafiltrada con Amicon (YM 30), sometido a incubación con SDS a diferente concentración (0.0, 0.003, 0.1 y 0.5 M), durante 0 s, 30 min, 1 h, y 96 h. Los gels A y B no tienen SDS incluido en el gel. Gel C, SDS en el gel. Volúmenes constantes de 20 μ L de muestra.

Aunado a esto, cuando el detergente se incluye directamente en el gel, la intensidad de la banda de peso aparente de 200 kDa, aumenta conforme se incrementa la concentración de SDS. El SDS es un detergente cargado, cuya región hidrofóbica se unirá a los aminoácidos no-polares de la molécula, favoreciéndose por causa de las repulsiones entre sus grupos cargados, el desdoblamiento de la molécula y la ruptura de enlaces de tipo no-covalente. Por otra parte, el medio con alta fuerza iónica favorecerá el aumento en el número de interacciones entre las proteínas y el disolvente, disminuyendo a su vez el número de las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de proteína.

El perfil electroforético nativo y en ausencia de SDS muestran una única banda con un peso molecular aparente superior a 300 kDa. En presencia de SDS, esta banda se disocia en cuatro bandas más, de manera dependiente del tiempo y concentración del detergente. Las evidencias muestran que en la formación del multímero de peso aparente mayor a 300 kDa están involucradas fuerzas de tipo no-covalentes, como podrían ser electrostáticas e



hidrofóbicas tal y como se sugiere para multímeros de globulinas en otras plantas (4-8, 28, 29, 45, 50, 53, 61, 67, 73, 88, 91, 92)

La aparición en estos geles de bandas diferentes a la de 300 kDa en la condición de 0 M de SDS puede deberse a la difusión que el SDS experimentó desde otra muestra que sí lo contenía, lo que se decidió verificar. La figura 9.7.2.2 muestra un nuevo gel nativo en completa ausencia del detergente, donde podemos observar la presencia de una banda única y de peso molecular aparentemente superior a los 300 kDa. En este gel se utilizó como muestra emulsión desestabilizada para descartar que la fuerza electrostática ejercida por la sal pudiera estar interfiriendo.

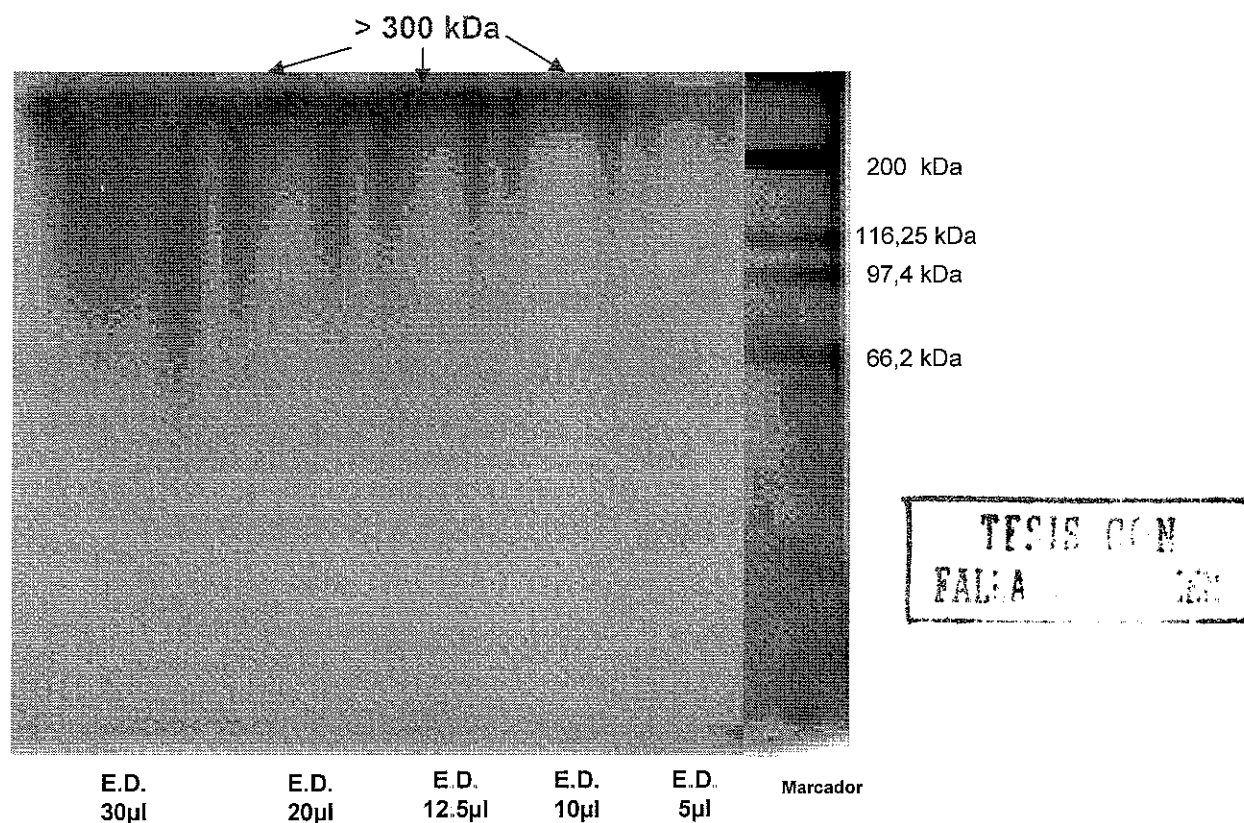


Figura 9.7.2.2 Efecto detergente SDS *Electroforesis nativa en ausencia de SDS. Separación en geles al 6% de acrilamida. Emulsión desestabilizada (E.D) en diferentes concentraciones.*

La banda de 300 kDa concuerda con el hexámero del que se ha hablado y que es reportado en distintos trabajos con distintas especies vegetales. Las bandas de 200 y 100 kDa concuerdan con los pesos esperados para el tetrámero y el dímero respectivamente. La

banda de 70 kDa en ajonjolí no se ha reportado; aunque existen otras explicaciones, en base a nuestras observaciones, creemos que esta banda podría corresponder a la asociación del monómero de 50-60 kDa con la proteína de peso menor a 13 kDa, o bien con la subunidad básica de pesos entre 20 y 25 kDa. Para que pueda ocurrir la primera propuesta, la proteína de 13 kDa debería ser producto de la disociación de algún intermediario, o directamente de la de 300 kDa, y estar unida a éste por alguna interacción de tipo no-covalente, susceptible de ruptura por la mera presencia de SDS. La factibilidad de la segunda propuesta radica en que la subunidad tuvo que provenir de la ruptura de enlaces disulfuro, ya sea como producto de la ebullición a la que se sometió con el buffer de tratamiento o durante el procesamiento al que el aislado estuvo expuesto durante su manipulación industrial, el cual incluía tratamiento alcalino y térmico. Aun si este fuera el caso, la subunidad también tendría que reasociarse al multímero bajo la acción de un enlace lo suficientemente débil como para ser roto por el SDS. Experimentos alejados del objetivo de esta tesis tendrían que llevarse a cabo para confirmar o desestimar tales hipótesis.

9.7.3 Efecto de los compuestos tris-HCl y urea.-

Con el fin de exponer las fracciones hidrofóbicas localizadas al interior de las proteínas se emplearon los agentes tris-HCl (tris(hidroximetil)aminometano.HCl) y urea, de con las propuestas de diversos autores (28, 30, 32, 64, 83, 84). El fundamento del uso de tris-HCl es que este actúa en algunas proteínas cargando la superficie expuesta de la molécula, provocando repulsión entre sus aminoácidos cargados y exponiendo al abrirse la cadena, la fracción hidrofóbica interior de las proteínas globulares inmersas en medio acuoso. Por su parte la urea actúa rompiendo interacciones no polares como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, uniones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas que actúan estabilizando a las proteínas.

La disolución de las muestras con tris-HCl a diferentes pH, y urea a diferentes concentraciones, no mostró a simple vista cambios en su solubilidad. El perfil electroforético en ausencia de β -mercaptoetanol de la muestra disuelta a pH de 3, 4, 8, 9, 10 y 11, la

fracción globulina extraída de la extracción secuencial, la emulsión desestabilizada y la misma emulsión desestabilizada disuelta con tris-HCl 1.5 M y a pH de 6.8, 8.0 y 9.0 (figura 9.7.3.1), mostraron la presencia abundante del triplete de 50-60 kDa. Se utilizaron estos valores de pH, ya que en ellos se había observado la mayor concentración de las bandas de interés, así como la presencia de las formas asociadas de mayor peso molecular.

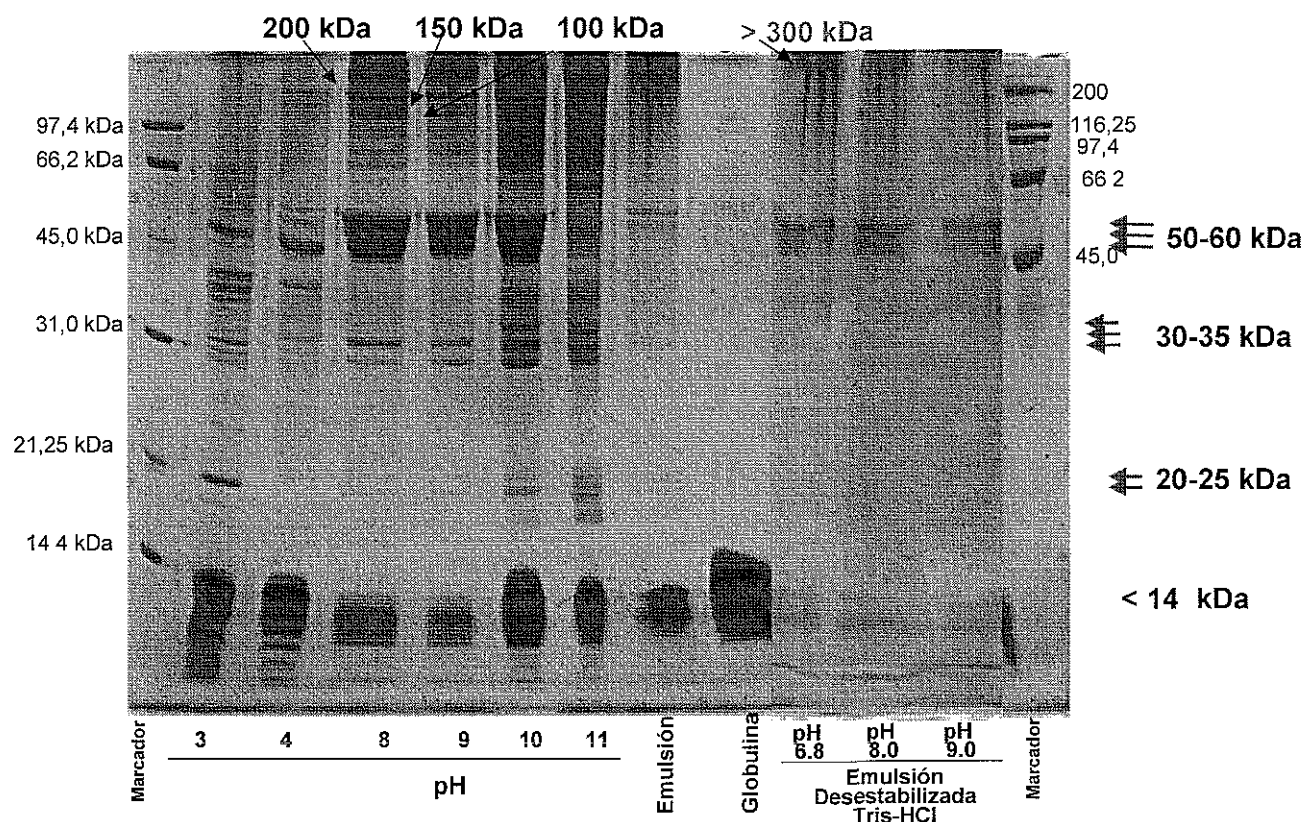


Figura 9.7.3.1. Efecto de los agentes urea y tris-HCl. Perfil electroforético sin β -mercaptoetanol. Separación en geles al 12.5% de acrilamida. Aislado disuelto a pH de 3, 4, 8, 9, 10 y 11; fracción globulina extracción secuencial; emulsión desestabilizada; emulsión desestabilizada disuelta con tris-HCl 1.5 M, pH 6.8, 8 y 9. Además todas las muestras fueron disueltas con disolución urea 3 M. Gel separador y concentrador preparados con disolución de urea 3 M.

Después de la disolución con urea 3 M tanto en la muestra como directamente en el gel, se siguen observando en los pH de 8, 9 y 10 la banda de peso mayor a 300 kDa; también se observan la banda de 150 kDa en pH 4, 8, 9 y 10; la banda de 200 se observa en pH de 4, 8, 9 y 10. Las muestras disueltas previamente con tris-HCl 1.5 M y a pH de 6.8, 8.0 y 9.0 presentan proteína en la zona de alto peso molecular, pero la presencia de un barrido,

debido probablemente a la alta concentración de sal, no permite determinar el peso de esa fracción proteínica.

Hasta este momento los resultados mostraron la presencia de las bandas de alto peso molecular, en extremos ácidos y básicos. En estas condiciones, las proteínas tendrán una carga parcial mayor que generará repulsión entre aminoácidos con carga del mismo signo, lo que a su vez generará un desdoblamiento de la cadena, parcial o completo, exponiendo de esta forma los grupos hidrofóbicos antes ocultos. La presencia de los agentes urea y tris-HCl respectivamente, contribuirán tanto al desdoblamiento de la cadena como a la solvatación de la misma. Es por esto que principalmente se atribuye la presencia de las formas asociadas del monómero a pH extremos a la generación de enlaces de tipo hidrofóbico entre los aminoácidos no polares expuestos por efecto de estas condiciones. Otros reportes (4, 6, 33, 41, 73, 91, 92), sugieren también la acción de fuerzas hidrofóbicas en la asociación de los multímeros de globulinas.

Los resultados muestran como componente mayoritario a pH de 8 y 9, al triplete de 50-60 kDa, mientras que a pH extremos de 3, 4, 10 y 11 será el grupo por debajo de 14 kDa. La fracción globulina y emulsión desestabilizada muestran también como mayoritario a dicho grupo de peso menor a 14 kDa. La evidencia parece indicar que la abundancia del grupo por debajo de los 14 kDa se halla relacionada con condiciones en las cuales los enlaces débiles pueden ser rotos, tales como extremos de pH y presencia de fuerzas iónicas considerables. De nuevo cabe hacer notar que en ausencia del agente reductor, las bandas de peso molecular alto (200, 150, 100, 75 y 66) se hallan presentes, por lo que se refuerza nuestra hipótesis de que se hallan presentes por la acción de enlaces disulfuro.

También como ya se mostró, el SDS tendrá un efecto en la disociación de las formas agregadas, por lo que se propone que ocurre una reasociación posterior a la disociación.

Pese a la ausencia de β -mercaptoetanol, se observa también la presencia del triplete de 30-35 kDa y del doblete de 20-25 kDa, debido probablemente a la acción combinada del SDS, el Tris-HCl y la urea, que provocan un alto grado de desdoblamiento de la cadena que genera tensión en los enlaces disulfuro, algunos de los cuales se rompen por el efecto de la temperatura y el tiempo de ebullición liberando las subunidades. Como se mencionó antes, existen reportes (28, 45) donde se presentan resultados similares.

9.7.4 Efecto de la acción combinada de sales y pH en la disolución de las proteínas.-

Distintos perfiles electroforéticos a lo largo de este estudio (Figuras: 9.5.2, 9.6.1, 9.7.1.1, 9.7.2.2, 9.8.3.1), habían presentado proteína incapaz de penetrar en el gel separador, debido a su elevado peso molecular. Las formas agregadas de proteína son comunes en globulinas de semillas y son las principales responsables de su baja disolución.

Se evaluaron diferentes combinaciones de sales y pH en virtud de su posible impacto sobre la disolución de la emulsión desestabilizada, que por sí misma era muy difícil de disolver. Las combinaciones que lograron disolver en alguna medida la muestra, fueron las siguientes:

Muestra A = 1 vol. emulsión desestabilizada + 1 vol. NaCl 1.7 M, pH 8

Muestra B = 1 vol. emulsión desestabilizada + 1 vol. tris-HCl 1.5 M, pH 8

Muestra C = 1 vol. muestra B + 1 vol. NaCl 1.7 M

= 1 vol. emulsión desestabilizada + 1 vol. tris-HCl 1.5 M, pH 8 + 2 vol. NaCl 1.7 M

Muestra D = 1 vol. muestra A + 1 vol. NaCl 1.7 M, llevada a pH 8

= 1 vol. emulsión desestabilizada + 3 vol. NaCl 1.7 M, pH 8

Muestra E = 1 vol. emulsión desestabilizada + 2 vol. NaCl 1.7 M, pH 10.7

(fuerza iónica = 1.13)

Los resultados indicaron que en la muestra A se consiguió eliminar en gran medida el precipitado, pero con formación de floculación en la superficie. En las muestras B y C no se observó ninguna apreciable disolución del precipitado. La muestra D presentó también floculación y disminución de precipitado. La muestra E se disolvió casi en su totalidad después de cuatro minutos de ebullición. Cuando la muestra A que presentaba precipitado se mezcló con NaCl 1.7 M a pH 8 se logró disminuirlo, así como la aparición de floculación. La imposibilidad de disolver el precipitado con NaCl 1.7 M en la muestra C previamente mezcladas y hervidas con tris-HCl a pH 8 lleva a pensar que para la disolución completa de los agregados deben de participar tanto fuerza iónica como un pH básico. Tanto la muestra B como la C ambas disueltas con tris-HCl, pH 8 presentaron muy baja solubilidad, esto concuerda con resultados anteriores donde el empleo de tris-HCl no mejoraba de manera evidente la solubilidad de la muestra. La muestra D donde se mezclaron 3 volúmenes de NaCl 1.7 M, pH 8.0 con 1 volumen de muestra a pH 7.0 indican que el pH juega un papel muy importante en la disolución de estos agregados. La casi completa disolución de la muestra E, bajo condiciones de alta fuerza iónica y pH extremadamente básico (NaCl 1.7 M, pH 10.7) confirma esta suposición. Probablemente la disolución de los agregados presentes en esta muestra ocurrió por una combinación de los siguientes mecanismos; por un lado, sabemos que la carga neta de la proteína a pH básicos es negativa y aumenta con el pH. Esta ganancia electrostática provocará repulsión en los átomos cargados del monómero y entre los átomos cargados de los distintos monómeros asociados, provocando así la apertura de las cadenas y un rearreglo más relajado de los agregados cuyos enlaces no fueron rotos por la repulsión electrostática. El segundo mecanismo depende de las interacciones que ocurren cuando una alta cantidad de iones, son incluidos en el medio, permitiéndose la hidratación de la molécula y la disminución en el número de interacciones hidrofóbicas. Cada uno de los mecanismos por si solo no fue suficiente para disolver el precipitado, sino que se necesitó de la acción conjunta de los dos, aunado al efecto de la temperatura que seguramente aportó la energía térmica para romper los enlaces ahora disponibles y que resistieron el efecto de los mecanismos anteriores.

Se encuentra reportado un comportamiento de asociación-disociación en función del pH y fuerza iónica en globulinas de diferentes especies vegetales, dando lugar a la formación de distintos complejos solubles e insolubles (4, 5, 14, 88). Otros reportes (14, 41) proponen que

las fuerzas que participan en la formación de los agregados en globulinas de semillas, son de tipo; hidrofóbico, electrostático como enlaces de hidrógeno y probablemente enlaces disulfuro. Nuestras observaciones son semejantes y llevan a pensar que la baja solubilidad que este tipo de formaciones presentan, les brindará una conformación compacta que permitirá almacenarlas en forma funcional en las semillas.

En las muestras disueltas con fuerza iónica de 1.7 y cuyo pH no era extremo se presentó el fenómeno de floculación. Los resultados presentados con anterioridad referentes al efecto del β -mercaptoetanol mostraron la presencia del fenómeno de floculación al enfriarse la misma muestra (emulsión desestabilizada) hervida en presencia del agente reductor; resultados similares son reportados (46) para emulsiones a base de 11S de soya. Aunque no descartamos el efecto del β -mercaptoetanol en relación a este fenómeno; lo atribuimos principalmente a la acción del tratamiento térmico que logró la ruptura de los agregados, ya sea en algún o en algunos tipos de intermediarios que, al descender la temperatura, logran reasociarse en agregados de estructura cuaternaria diferente a la original y donde probablemente sus dominios hidrofóbicos quedaron orientados hacia el interior del agregado. Creemos que la presencia de iones en concentraciones altas pudo fomentar esta nueva asociación, al provocar una orientación diferente tanto de los aminoácidos con carga, como de los que estén físicamente cercanos, ya que el efecto de esta reorientación no será exclusivamente de tipo local.

Los resultados de disolución con sales y pH arrojaron que para la completa disolución de las muestras es necesaria tanto la presencia de fuerza iónica alta (1.13), como de pH extremo (cerca a 10). La disminución de precipitado solo pudo observarse donde las condiciones presentaban pH básicos y alta fuerza iónica. La aparición de floculación se dio en aquellos casos donde por un lado hubo disminución de precipitado, y por el otro no existió una completa disolución del mismo, sugiriendo que la parcial disolución de los agregados, es la responsable de la aparición de este fenómeno, quizás por un parcial desdoblamiento de las cadenas que lleva a una estructura cuaternaria con diferentes características en su comportamiento de disolución.

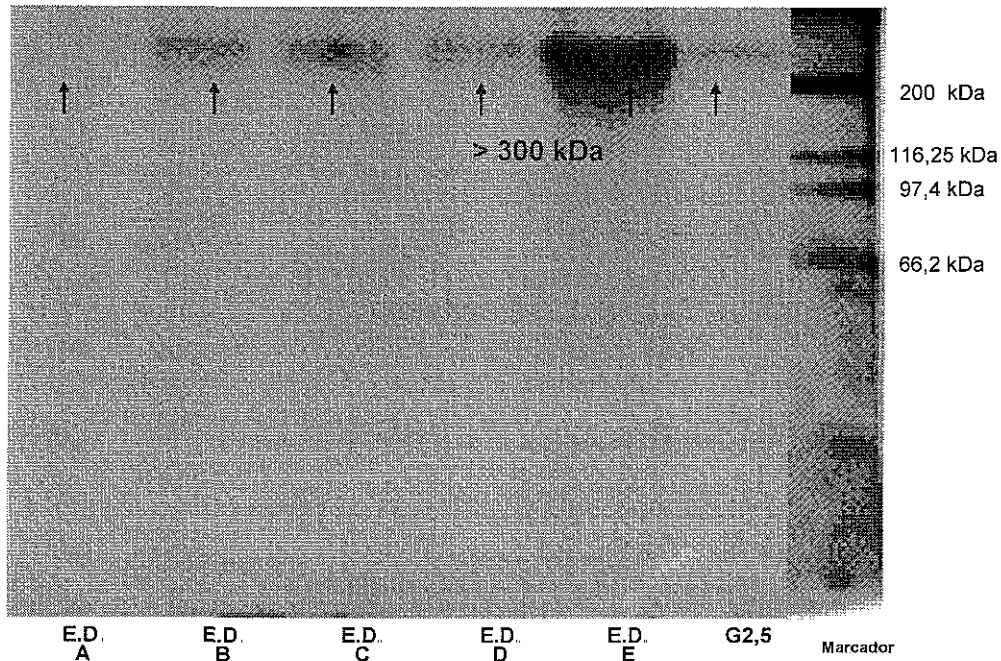


Figura 9.7.4.1 Efecto conjunto de sales y pH. Electroforesis nativa. Ausencia de SDS. Separación en geles al 6% de acrilamida. Emulsión desestabilizada (E.D.) tratada bajo diferentes condiciones; Aislado disuelto con 0.34 M NaCl (G2,5S).

La figura 9.7.4.1 muestra el perfil electroforético en condiciones nativas de las muestras disueltas bajo los tratamientos presentados anteriormente. Se puede observar la presencia de una banda de peso molecular aparente superior a 300 kDa en todos los carriles, incluyendo el del aislado disuelto con NaCl 0.34 M puesto allí como control. Esto evidencia que aun en los tratamientos donde no se observó disminución del precipitado sí existió algún grado de disolución.

La presencia de la misma banda en todos los casos pone de manifiesto que, al menos bajo estas condiciones de disolución, la proteína responsable de la capacidad de formar y estabilizar emulsiones es solo una, de peso molecular aparente mayor a 300 kDa y con peso molecular similar a la extraída del aislado con una fuerza iónica de 0.34 M.

FALLA EN ORIGEN

9.8. Determinación de pesos moleculares.-

Con el fin de determinar el peso molecular de la proteína mayoritaria tanto del aislado como de la emulsión desestabilizada, se decidió hacer uso de técnicas cromatográficas. Se utilizó cromatografía de exclusión molecular, con las variables reportadas en la metodología de este trabajo. Se usó esta cromatografía por ser la que mejores resultados arrojó en la purificación de globulinas en diferentes especies vegetales (22, 46, 87, 89), esta técnica se basa en que; dependiendo de la geometría del material de que está compuesta la fase estacionaria, las moléculas pequeñas podrán penetrar el espacio interparticular del gel y por tanto su migración a lo largo de la columna será retardada. El grado de este retardamiento será dependiente del tiempo de residencia de la molécula en el espacio interparticular, y es inversamente proporcional al tamaño de la molécula. Si una molécula es lo suficientemente grande como para entrar en el espacio interparticular entonces su migración no será retardada por la fase estacionaria. El perfil de elución de una proteína dependerá no sólo de tamaño molecular, sino también de su forma.

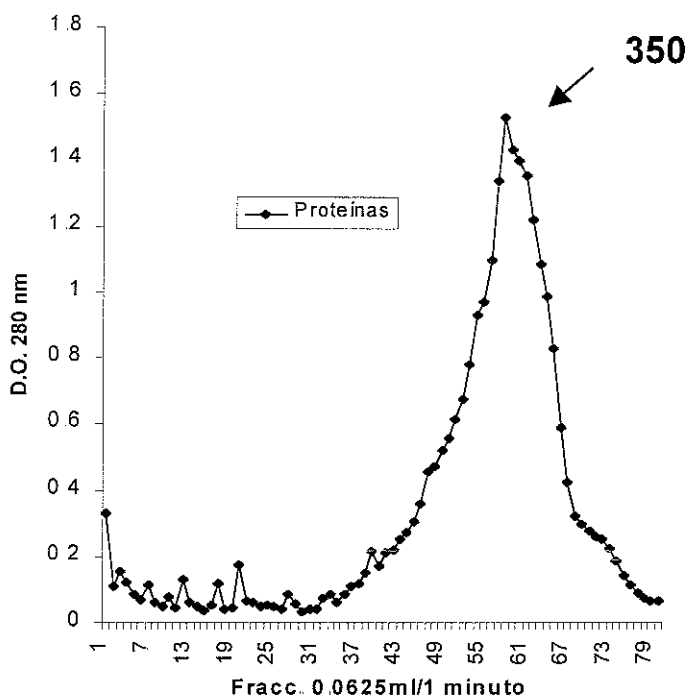


Figura 9.8.1 Determinación de pesos moleculares. Perfil cromatográfico. Aislado disuelto con 0.34 M NaCl, pH 6.78. Fase móvil tris 0.02M +NaCl 0.3 M, pH 7.8. Columna Superdex 200. Muestra inyectada 0.5 mL. La muestra se inyectó sin diluir con la fase móvil. Todas las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 1 min. Las fracciones recolectadas fueron de 0.0625 mL/min.

La figura 9.8.1 muestra el perfil cromatográfico del aislado disuelto con fuerza iónica de 0.34 y pH 6.74, donde se puede observar la presencia mayoritaria de un solo pico de peso molecular 350 kDa. La caracterización electroforética de la fracción correspondiente, extraída de la cromatografía mostró, como puede observarse en la figura 9.8.2 que en condiciones nativas era mayoritaria, la presencia de una única banda de peso molecular aparente mayor a 300 kDa. El perfil bajo condiciones desnaturalizantes mostró la disociación de esta banda en otras de pesos: 200, 60, 30, 20 y menor a 14 kDa. Estos resultados refuerzan la propuesta de disociación y reasociación del multímero de 350 kDa como dependiente del pH y fuerza iónica del sistema.

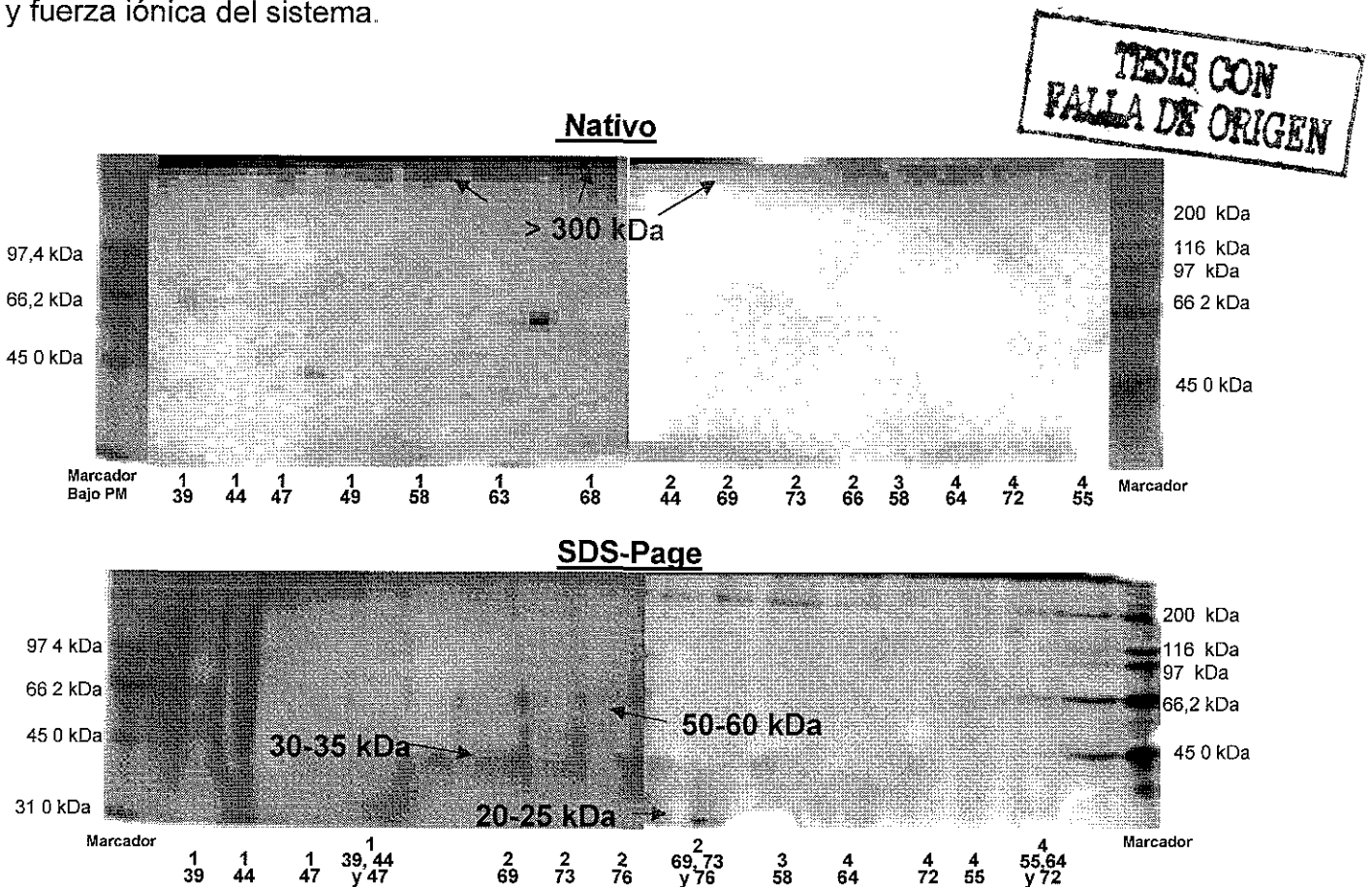


Figura 9.8.2. Determinación de pesos moleculares. SDS-PAGE y electroforesis nativa. Fracciones recuperadas después de la cromatografía por filtración en gel. Separación en geles al 10% de acrilamida. Picos de diferentes cromatogramas.

Para concluir este trabajo se realizó la comparación de los perfiles electroforéticos entre las proteínas de la emulsión desestabilizada, respecto al aislado disuelto con 0.34 M de NaCl y de las fracciones extraídas de la cromatografía de exclusión molecular. La figura

9.8.3 muestra el perfil electroforético en condiciones nativas donde se observa que las tres muestras comparten el mismo perfil, mismo que muestra a la banda de peso mayor a 300 kDa, como la única que aparece, mientras que por su lado, en condiciones no reductoras el triplete de 50-60 kDa y el de 30-35 kDa serán los únicos que se observan.

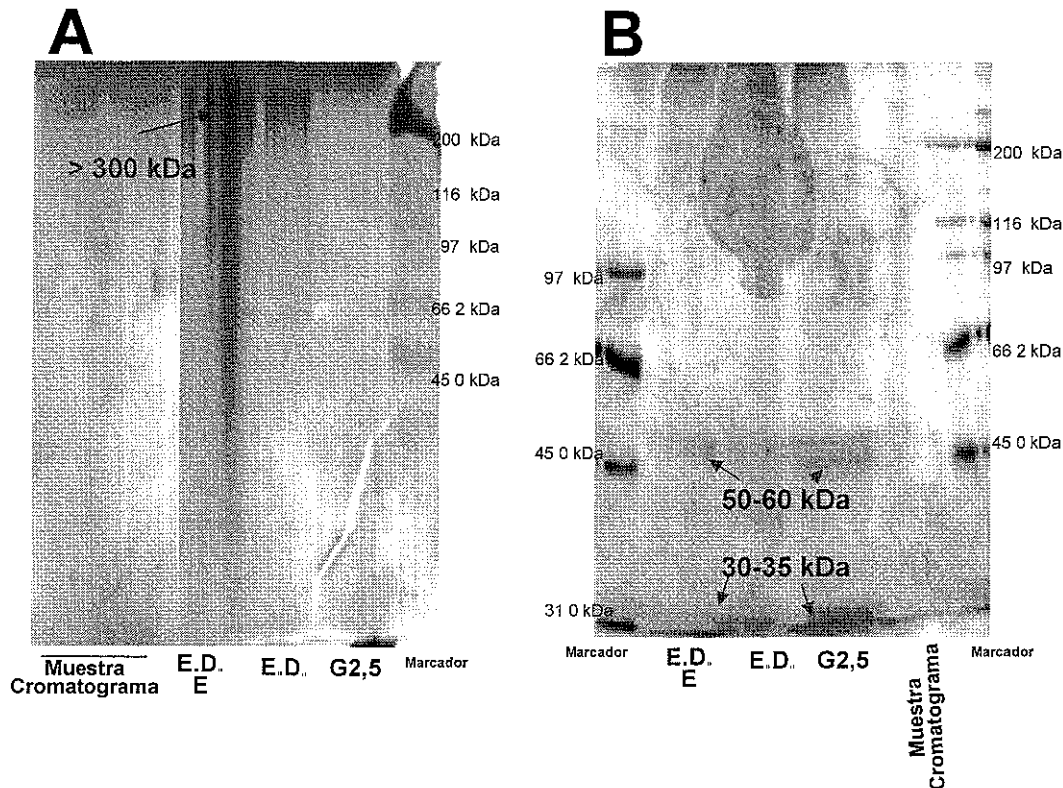


Figura 9.8.3. A) Electroforesis nativa (separación en geles al 10% de acrilamida) y B) en ausencia de β -mercaptoetanol (separación en geles al 6% de acrilamida). Muestras: aislado disuelto con 0.34 M de NaCl; emulsión desestabilizada (E.D.); emulsión desestabilizada disuelta con 2 veces su volumen de NaCl 1.7 M, pH 10.7 (E.D. E); fracciones extraídas de la cromatografía de exclusión molecular concentradas por liofilización.

Estos resultados, con mucha certeza indican que la proteína responsable de la formación y estabilización de emulsiones es única y que puede ser extraída del aislado de ajonjolí mediante disoluciones con NaCl 0.34 M y por último, que es la misma que se extrajo por cromatografía de exclusión molecular como la proteína mayoritaria cuando el pH del sistema era cercano a 7.0. Estos resultados concuerdan con la proteína reportada como globulina 11S en diferentes trabajos sobre diferentes especies vegetales (2, 4-8, 14, 22, 28-33, 35, 38, 41, 45, 46, 50, 51, 53-55, 57, 59, 61, 72, 73, 81, 84, 87-89, 91, 92).

10.0 Conclusiones.-

1. La muestra analizada contiene un 92.8% de proteína, por lo que podemos considerarla como un aislado proteínico.

2. El aislado presentó un comportamiento de disolución común para muestras proteínicas donde, al ser disuelto en el rango de pH de 2 a 12, presentó una mínima disolución entre valores de 6 y 7 y una máxima disolución en los extremos ácidos y básicos.

3. En presencia de condiciones desnaturizantes se observó la presencia de dos tripletes (50-60, 30-35 kDa) y un doblete (20-25 kDa) en todos los valores de pH, aunque con baja intensidad en pH de 6-7, y con mayor intensidad en los mismos valores de pH donde ocurre la máxima disolución del aislado. En ausencia de un agente reductor y para los mismos valores de pH se observó una drástica disminución de los grupos de 20-25 y 30-35 kDa, así como un notorio incremento en el grupo de 50-60 kDa.

4. Bajo condiciones reductoras y con mayor abundancia en el intervalo de pH de 5-7, se observó la presencia en gran intensidad de una banda de peso molecular de 14 kDa, así como otras dos de pesos 9 y 4 kDa. Estas dos últimas no se observaron en condiciones no-reductoras, al mismo tiempo que la intensidad de la banda de 14 kDa se vio incrementada.

5. En condiciones no-reductoras y en valores de pH distintos a 5-7 se observa la presencia de bandas con pesos moleculares altos (76, 100, 120, 150, 220 y 250 kDa), mismas que en presencia de un agente reductor no pudieron ser observadas. Por su parte bajo estas condiciones desnaturizantes, observamos la presencia de tres bandas de pesos moleculares 28, 43 y 64 kDa, que en ausencia de un agente reductor no fueron ya observadas.

6. En todas las condiciones ensayadas, el aislado presentó una completa incorporación de aceite, dando lugar a la formación de emulsiones aceite-agua; esta propiedad se mantuvo, aún después de que la emulsión fuese desestabilizada mediante el

uso de una fuerza externa, llegando el aceite incorporado a representar el 71% (v/v) del total de la mezcla (para 8% (p/v) de proteína) antes de su desestabilización, y manteniendo bajo esas condiciones, la presencia de 98.55% de emulsión después de su desestabilización. Bajo estas condiciones se obtuvo una relación mayor a 12, para el cociente volumen de emulsión formada y desestabilizada, por peso de proteína inicialmente adicionada.

7. Conforme se incrementaba en el sistema (emulsión aceite-agua) tanto la cantidad de aceite como la de proteína adicionada, pudo observarse un incremento en la relación de emulsión formada, al tiempo que tanto la fase acuosa como el precipitado disminuían. De aquí se concluye que en la formación y estabilización de emulsiones aceite-agua participan tanto las proteínas solubles como las insolubles del aislado de ajonjolí.

8. Los análisis electroforéticos sobre la proteína extraída de la emulsión mostraron que es mayoritariamente una y con un peso molecular superior a 300 kDa. La solubilidad de la proteína se vio favorecida por la adición de sales al sistema, sin embargo para la completa disolución de la proteína se requirió tanto de fuerza iónica alta como de pH extremo.

9. La emulsión desestabilizada bajo condiciones no-reductoras mostró tanto las bandas de peso molecular entre 50-60 kDa y menor a 14 kDa como la de peso superior a 300 kDa. Estos datos sugieren que en la formación de la proteína nativa (350 kDa), extraída de la emulsión desestabilizada, participan estas subunidades a través de uniones débiles.

10. La disminución en la intensidad de la banda de alto peso molecular (350 kDa) en presencia de un agente reductor permite concluir que en su formación participan enlaces disulfuro. Así también, la aparición de un triplete de bandas de pesos 30-35 kDa y de un doblete de 20-25 kDa, así como de bandas de peso molecular 64 y 29 kDa, sugiere que éstas también participan en la formación de la de 350 kDa, a través de enlaces disulfuro y muy probablemente mediante la formación de intermediarios. La disminución en la intensidad del grupo de 50-60 kDa bajo estas condiciones, sugiere que éste pudiese ser el principal intermediario en la formación de la de 350 kDa.

11. Los ensayos utilizando tanto distintos disolventes como diferentes intensidades de fuerza iónica y centrifuga no permitieron la separación de los grupos proteínicos

principales (20-25, 30-35 y 50-60 kDa). Sin embargo en todos ellos se confirmó que en condiciones desnaturizantes era mayoritaria la presencia del triplete de 30-35 kDa y del doblete de 20-25 kDa, mientras que en ausencia de un agente reductor, la mayor intensidad la presentaba el triplete de 50-60 kDa. Los ensayos en presencia y ausencia de agente reductor confirmaron este comportamiento.

12. En todos los ensayos en electroforesis en presencia de SDS en los que se probaron diferentes disolventes, pH y/o fuerza iónica, así como donde se usaron distintas intensidades de fuerza centrífuga mostraron la presencia de bandas de proteína por debajo de los 14 kDa. Esta no desapareció tras ensayos de ultrafiltración con límite de exclusión superior a ese valor, y apareció tanto en el retenido como en el sobrenadante. La electroelución del triplete de peso molecular 50-60 kDa también mostró proteína por debajo de los 14 kDa. Ninguno de los ensayos en ausencia del detergente SDS de las diferentes muestras, mostró proteína por debajo de los 14 kDa.

13. Los distintos ensayos en ausencia de un agente reductor mostraron la presencia de bandas de pesos moleculares altos (250, 200-220, 150, 100-120, 70-76 kDa) mismas que en presencia de un agente reductor no fueron observadas.

14. La electroforesis nativa en presencia de distintas concentraciones del detergente SDS y a diferentes tiempos de contacto mostraron que la banda única observada en peso superior a los 300 kDa se disocia en bandas de 200, 100, 70 y 51 kDa como consecuencia de la exposición al detergente. Esto demuestra que la existencia de estas bandas está determinada en gran medida por la ruptura de interacciones débiles entre ellas.

15. El patrón de bandeo en los diferentes ensayos sugiere un comportamiento de asociación y disociación de proteínas, que incide en la aparición y desaparición de bandas de diferentes pesos moleculares. La proteína cuyo peso molecular en forma nativa es de 350 kDa, presenta un comportamiento de disociación-asociación que está directamente influenciado por el pH, fuerza iónica, fuerzas físicas y por la presencia de algunos agentes químicos. La figura 10.1 muestra un modelo propuesto por nosotros donde se visualiza la composición de las distintas subunidades formadoras de esta proteína, en función de la presencia de detergente y agente reductor.

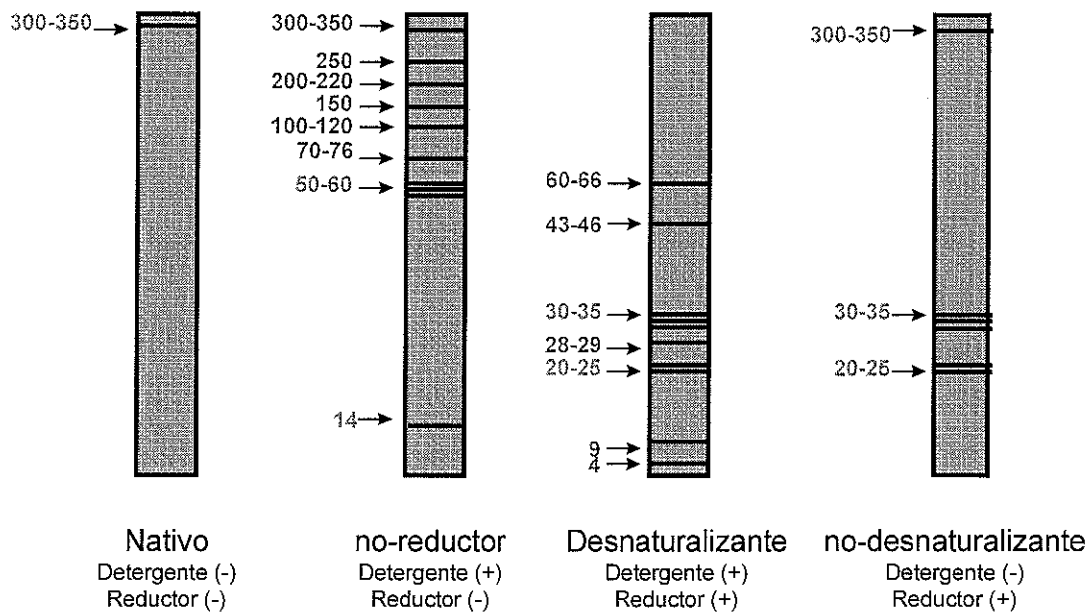


Figura 10.1. Modelo propuesto para la disociación-reasociación de la proteína mayoritaria del aislado de ajonjolí bajo estudio.

16. El perfil cromatográfico del aislado disuelto con fuerza iónica de 0.34 y pH cercano a 7 mostró la presencia mayoritaria de un solo pico con peso molecular de 350 kDa. La electroforesis nativa de las fracciones recuperadas de la cromatografía mostró una banda única de peso molecular mayor a 300 kDa. El SDS-PAGE de las mismas fracciones demostró la disociación de dichas bandas en otras de 50-60, 30-35 y 20-25 kDa.

17. Resultan iguales los perfiles electroforéticos de las fracciones recuperadas de la cromatografía comparados contra los de la emulsión desestabilizada, la emulsión desestabilizada completamente disuelta con elevada fuerza iónica y pH, así como del aislado disuelto también con fuerza iónica elevada. En condiciones nativas se confirmó en todos los casos la aparición de una banda única, de peso molecular superior a 300 kDa, mientras que en condiciones no-reductoras se presentó mayoritariamente el triplete de 50-60 kDa.

18. Se sabe que la fracción globulina de amaranto adopta el estado de menor energía libre cuando es absorbida en la interfase aceite-agua de la gota, produciendo así una emulsión más estable y disminuyendo a su vez la proporción de coalescencia generada; por

otra parte se reporta que la alta capacidad para formar emulsiones en la globulina 11S de soya se verá afectada por la formación de agregados de alto peso molecular que impiden la correcta orientación de sus residuos hidrofóbicos en la fase oleosa de la gota (20, 46, 91,92); por lo que era de esperarse que también la globulina 11S de ajonjolí adoptase el estado más estable termodinámicamente, es decir, formando un multímero y que éste no fuese de muy elevado peso molecular.

11.0 Perspectivas.-

Tanto el multímero como las formas agregadas de la globulina 11S de ajonjolí estarán estabilizadas principalmente por interacciones de tipo no covalente, mismas que pensamos son básicamente de tipo electrostáticas e hidrofóbicas. Probablemente el mecanismo primario de agregación de estas proteínas suceda entre sus residuos cargados, en particular sus residuos básicos (7, 8, 35, 36, 57, 97).

Como ya se mencionó, en la formación del multímero participan enlaces disulfuro, quizás producto de reacciones de intercambio (10,36, 57).

Un conocimiento mas completo de las formas asociadas a las diferentes condiciones de pH y fuerza iónica permitirá probablemente un mejor discernimiento sobre el tipo de fuerzas que estabilizan estas estructuras, generándose al mismo tiempo el conocimiento para manipular esta proteína con fines nutricionales y funcionales.

Estudios actuales indican presencia de casos de respuesta alérgica atribuida al consumo de ajonjolí descascarillado (44, 66, 67). Estos estudios presentan inconsistencias sobre la(s) proteína(s) responsables de esta respuesta, sin embargo todo indica que se trata de esta misma proteína en alguno(s) de sus estados de asociación-disolución por lo que se refuerza la necesidad de identificar las condiciones bajo las cuales estos mecanismos ocurren.

En México durante el periodo 1995-1999, el promedio anual de producción de semilla de ajonjolí fue de 26 mil Ton; considerando que aproximadamente el 25% de la composición de la semilla corresponde a proteína, se produjo anualmente un promedio de 6.5 mil Ton de proteína de esta semilla, de la cual se halla reportado que en promedio, la globulina 11S representa el 65% de la proteína total, por lo que esto significa una producción promedio anual de 4.225 mil Ton de globulina 11S de ajonjolí. Por su parte la producción de esta semilla a nivel mundial, durante el mismo período fue de 2,573 mil Ton lo que representó un promedio anual de producción de globulina 11S de 418 mil Ton. En México en el año 2001, la producción anual de esta semilla se incrementó en 57%; estos números por si mismos

indican la conveniencia de incrementar la caracterización y el estudio de esta proteína, con el fin de promover una mayor explotación de la misma.

Debido a que las proteínas de reserva se hallan bastante conservadas en diferentes leguminosas, así como al elevado consumo de estas semillas a lo largo del hemisferio; es de relevante importancia una mayor comprensión sobre sus propiedades funcionales, bioquímicas y nutrimentales.

12.0 Bibliografía.-

- 1.- AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist*. 16th Ed.
- 2.- Añon M. C., Sorgentini D. A., Wagner J. R. (2001). **Relationships between different hydration properties of commercial and laboratory soybean isolates.** *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4852-4858
- 3.- Badifu G. I. and Akpagher E. M. (1996). **Effects of debittering methods on the proximate composition, organoleptic and functional properties of sesame (*Sesamum indicum L.*) seed flour.** *Plant Foods Hum. Nutr.* **49** (2): 119-126
- 4.- Carbonaro M., Nicoli S., and Musci G. (1999). **Heat induced aggregation of *Phaseolus vulgaris* I. proteins: an electron spin resonance study.** *J. Agric. Food Chem.* **47**: 2188-2191
- 5.- Carbonaro M., Vecchini P., and Carnovale E. (1997). **Protein solubility of raw and cooked bean (*Phaseolus vulgaris*): role of the basic residues.** *J. Agric. Food Chem.* **45**: 3387-3394
- 6.- Carbonaro M., Cappelloni M., Nicoli S., Lucarini M. and Carnovale E. (1993). **Solubility-digestibility relationship of legume proteins.** *J. Agric. Food Chem.* **41**: 1169-1175
- 7.- Castellani O., Martinez N. and Añon C. (1999). **Role of disulfide bonds upon the structural stability of an amaranth globulin.** *J. Agric. Food Chem.* **47**: 3001-3008
- 8.- Castellani O., Martinez N. and Añon C. (1998). **Structural modifications of an amaranth globulin induced by pH and NaCl.** *J. Agric. Food Chem.* **46**: 4846-4853
- 9.- Cheftel J. C., Cuq J. L. y Lorient D. (1989). **Proteínas alimentarias. Capítulo 4.** Ed. Acibia. España.
- 10.- Chou K.C., Zhang C.T. and Maggiora G.M. (1997). **Disposition pf amphiphilic helices in heteropolar environments.** *Proteins.* **28** (1): 99-108
- 11.- Dargorn-Scaviner C., Guéguen J., and Lefebvre J. (1997). **Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors.** *J. Food Science.* **52** (2): 335-341
- 12.- Damodaran S. y Paraf A. (1997). **Food proteins and their applications.** p.p. 1-24. Ed. Marcel Dekker. U. S. A.
- 13.- Dench J. E. (1982). **Extraction of nitrogenous material from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus (L.)*) flour and the preparation and properties of protein isolates.** *J. Sci. Food Agric.* **33**, 173-184
- 14.- Derbyshire E., Wright D. J. and Boulter D. (1976). **Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds.** *Phytochem.* **15**: 3-24

- 15.- Egbekun M.K. and Ehieze M.U. (1997). **Proximate composition and functional properties of fullfat and defatted beniseed (*Sesamum indicum* L.) flour.** *Plant Foods Hum. Nutri.* **51**: 35-41
- 16.- ExPASy Molecular Biology Server. (2002). <http://www.expasy.ch/>
- 17.- FAO. FAOSTAT. (2002). Agriculture Data. <http://apps.fao.org>
- 18.- FAO/WHO/ONU. (1985). **Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/ONU experts consultation.** World Health Organization Technical Report Series 724.
- 19.- Fennema O. R. (1996). **Food Chemistry.** 3th Edition. Ed. Marcel Dekker Inc. U. S. A.
- 20.- Fidantsi A. and Doxastakis G. (2001). **Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates.** *Coll. Surf. B: Biointerfaces.* **21**: 119-124
- 21.- Flores A. I. (1997). **Modificación enzimática y química del gluten de maíz. posibilidades de utilización en la industria alimentaria.** Tesis de Maestría. Facultad de Química. U.N.A.M.
- 22.- Freitas R., Ferreira R. and Teixeira A. (2000). **Use of a single method in the extraction of the seed storage globulins from several legume species. Application to analyse structural comparisons within the major classes of globulins.** *Int. J. Foods Sci. Nutr.* **51**: 341-352
- 23.- Friberg S. E., Larsson K. (1997). **Food emulsions.** Third ed. Marcel Dekker Inc. U.S.A.
- 24.- García A. H. y Vázquez D. R. (1998). **Cuantificación de proteínas: una revisión.** *BioTecnología.* **3**: 77-88
- 25.- Gnanassambandam R. and Zayas J.F. (1992). **Functionality of wheat germ protein in comminuted meat products as compared with corn germ and soy proteins.** *J. Food Sci.* **57** (4): 829-833
- 26.- Goldberg I. (1994). **Functional foods. Designer foods, pharma foods, nutraceuticals.** Ed. Chapman and Hall. U.S.A.
- 27.- GOR IV. Secondary Structure Prediction Method. (2002). Pole Bio-Informatique Lyonnais. Garnier *et al.*, 1996. http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html
- 28.- Gorinstein S., Delgado-Licon E., Pawelzik E., Heriyati P. H., Weisz M. and Trakhtenberg S. (2001). **Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, amino acid analysis, circular dichroism, and differential scanning calorimetry measurements.** *J. Agric. Food Chem.* **49**: 5595-5601

- 29.- Gorinstein S., Zemser M. and Paredes-Lopez O. (1996). **Structural Stability of Globulins.** *J. Agric. Food Chem.* **44**: 100-105
- 30.- Gorinstein S., Zemser M., Friedman M., Vasco-Mendez N. and Paredes-Lopez O. (1996). **Denatured-induced conformations of globulins.** *J. Agric. Food Chem.* **44**: 93-99
- 31.- Guéguen J., Bollecker S., Schwenke K. D. and Raab B. (1990). **Effect of succinylation on some physicochemical and functional properties of the 12S storage protein from rapessed (*Brassica napus L.*).** *J. Agric. Food Chem.* **38** (8): 61-69
- 32.-Hasegawa K., Murata M. and Fujino S. (1978). **Characterization of subunits and temperature-dependent dissociation of 13S globulin of sesame seed.** *J. Agric. Biol. Chem.* **42** (12): 2291-2297
- 33.-Hayakawa S., and Nakai S. (1985). **Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins.** *J. Food Science.* **50**: 486-491
- 34.- Hettiarachchy N., Ziegler G. (1994). **Protein functionality in food systems.** IFT Basic symposium series. Institute of Food Technologists. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. p.p. 147-179, 311-323.
- 35.- Hudson B. J. F. (1984). **New and developing sources of food proteins.** A Chapman and Hall Food Science Book. U.K.
- 36.- ISSSA. (2002). Annual Global Review of Commercialized Transgenic (GM) Crops. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. ISAAA Briefs No. 24: Preview. 2002
- 37.- Jpred version 2. Barton Group - EMBL-European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton Cambs. 2002. <http://jura.ebi.ac.uk:8888/>
- 38.- Jung R., Scott M. Paul, Nam Y. W, Beaman T. W., Bassüner R., Saalbach I., Müntz K. and Nielsen N. C. (1998). **The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins.** *Plant Cell.* **10**: 343-357
- 39.- Kanny G., de Hauteclocque C. and Moneret-Vautrin D. A. **Sesame seed and sesame seed oil contain masked allergens of growing importance.** *Allergy* **51** (12): 952
- 40.- Kato A., Osaka Y., Matsudomi N. and Kobayashi K. (1983). **Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation.** *Agric. Biol. Chem.* **47** (1): 33-37
- 41.- Kinsella J. E. and Mohite R. R. (1985). **New Protein Foods. Vol. 5.** p.p. 435-455. Academic Press. U.S.A.
- 42.- Kinsella J. E., Mohite R. R. (1976). **Functional properties of protein in foods: a survey.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **101**: 47-168

- 43 - Krebs K.E., Phillips M.C. (1984). **The contribution of alpha-helices to the surface activities of proteins.** *FEBS Lett.* **175** (2): 263-266
- 44.- Laemmli U. K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature.* **227**: 680-685
- 45.- Lakemond C., de Jongh H., Hessing M., Gruppen G. and Voragen A. (2000). **Heat denaturation of soy glycinin: influence of pH and ionic strength on molecular structure.** *J. Agric. Food Chem.* **48**: 1991-1995
- 46.- Liu M., Lee D. S. and Damodaran S. (1999). **Emulsifying properties of acidic subunits of soy 11S globulin.** *J. Agric. Food Chem.* **47**: 4970-4975
- 47.- López Rodrigo. (2001). SRS Administrator. Lion Bioscience. EBI. European Bioinformatics Institute. <http://srs.ebi.ac.uk/>
- 48.- Mahajan A., Dua S., and Bhardwaj S. (2002). **Simple physical treatment as an effective tool to improve the functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* Var. *toria*) and sesame seed (*Sesamum indicum*) meals.** *Int. J. Food Sci. Nutr.* **53** (2): 93-102
- 49.- Mahajan A., Bhardwaj S., and Dua S. (1999). **Traditional processing treatments as a promising approach to enhance the functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* Var. *toria*) and sesame seed (*Sesamum indicum*) meals.** *J. Agric. Food Chem.* **47**: 3093-3098
- 50.- Marcone M. F. and Yada R. Y. (1992). **Study of the charge profile and covalent subunit association of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*.** *J. Agric. Food Chem.* **40**: 385-389
- 51.- Maruyama N., Sato R., Wada Y., Matsumura Y., Goto H., Okuda E., Nakagawa S., and Utsumi S. (1999). **Structure-physicochemical function relationships of soybean B-conglycinin constituent subunits.** *J. Agric. Food Chem.* **47**: 5278-5284.
- 52.- McClements D. J. (1999). **Food emulsions. principles, practice and techniques.** CRC Press. U.S.A.
- 53.- Mills C., Huang L., Noel T., Gunning P. and Morris V. (2001). **Formation of thermally induced aggregates of the soya globulin B-conglycinin.** *Bioch. Biophys. Acta.* **1547**: 339-350
- 54.- Müntz Klaus. (1998). **Deposition of storage proteins.** *Plant Mol. Biol.* **38**: 77-99.
- 55.- Nakamura R., Konishi Y., Kojima A. and Nakatani N. (1998). **Globulin and albumin-2 associated with protein bodies in *Amaranthus cruentus* seeds.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62** (6): 1231-1233

- 56.- O.N.U. (1995). Resolucion 50/109 Relativa a la Cumbre Mundial Sobre la Alimentacion Aprobada por la Asamblea General de las Naciones Unidas.
- 57.- Osuna-Castro J., Rascón-Cruz Q., Napier J., Fido R., Shewry P. and Paredes-López O. (2000). **Overexpression, purification, and in vitro refolding of the 11S globulin from amaranth seed in *Escherichia coli***. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 5249-5255.
- 58.- Pajno G. B., Passalacqua G., Magazzu G., Barberio G., Vita D., and Canonica G. W. (2000). **Anaphylaxis to sesame**. *Allergy Net.* 199-201
- 59.- Pastorello E. A., Varin E., Farioli L., Pravettoni V., Ortolani C., Trambaioli Ch., Fortunato D., Giuffrida M. G., Rivolta F., Robino A., Calamari A. M., Lacava L. and Conti A. (2001). **The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin**. *J. Chromat. B.* **756**: 85-93
- 60.- Pétersen G. L. (1977). **A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable**. *Anal. Biochem.* **83**: 346-356
- 61.- Petrucci S. and Añón M. C. (1995). **Thermal aggregation of soy protein isolates**. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 3035-3041
- 62.- Phillips M. C. (1981). **Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams**. *Food Tech.* 50-57
- 63.- Plietz P., Damaschun G., Zirwer D., Gast K. D., Schwenke K. D. and Prakash V. (1986). **Shape and quaternary structure of α -globulin from sesame (*Sesamum indicum* L.) seed as revealed by small angle x-ray scattering and quasi-elastic light scattering**. *J. Biological Chem.* **261** (27): 12686-12691
- 64.- Poon S., Clarke A. and Schultz C. (2001). **Effect of denaturants on the emulsifying activity of proteins**. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 281-286
- 65.- Poon S., Clarke A., Currie G. and Schultz C. (2001). **Influence of alpha-helices on the emulsifying properties of proteins**. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65** (8): 1713-1723
- 66.- Popineau Y., Bollecker S., et Thebaudin J. Y. (1998). **Caractérisation biochimique et fonctionnelle des protéins de gluten désamidées partiellement en conditions ménagées**. *Sciences des Aliments.* **8** (4): 411-430
- 67.- Prakash V., Nandi P. K. and Jirgensons B. (1980). **Effect of sodium dodecyl sulfate, acid, alkali, urea and guanidine hydrochloride on the circular dichroism of α -H-globulin of *Sesamum indicum* L.** *Int. J. Pept. Protein. Res.* **15** (4): 305-313
- 68.- The PredictProtein Server (2000). Burkhard Rost. Cubic. <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>
- 69.- ProtScale Tool. Amino acid scale: Hydropathicity. (2002). Doolittle K. J., (1982). *J. Mol. Biol.* **157**:105-132. <http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>

- 70.- Rajendran S. and Prakash V. (1988). **Isolation and characterization of β -globulin low molecular weight protein fraction from sesame seed (*Sesamum indicum* L.).** *J. Agric. Food Chem.* **36** (2): 200-206
- 71.- Ramos M. J. A. (1992). **Caracterización agroindustrial de 25 genotipos seleccionados de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) para emplearse como fuente en el mejoramiento genético.** Tesis Profesional. UACH. México..
- 72.- Renkema J. M. S., Lakemond C. M. M., de Jongh H. H. J., Gruppen H. and van Vliet T. (2000). **The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins.** *J. Biotech.* **79**: 223-230
- 73.- Riblett A. L., Herald T. J., Schmidt K. A. and Tilley K. A. (2001). **Characterization of β -conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes.** *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4983-4989
- 74.- Rivero de P. M. (1983). **Some functional and utilization characteristics of sesame flour and proteins.** *J. Food Sci.* **48**: 1145-1147
- 75.- Robbelen G. (1989). **Oil crops of the world.** McGraw Hill. U.S.A
- 76.- Robles R. (1991). **Producción de oleaginosas y textiles.** 3a. Ed. Limusa. México.
- 77.- Saad R. y Perez C. (1984). **Functional and nutritional properties of modified proteins of sesame (*Sesamum indicum*, L.).** *Arch. Latinoam. Nutr.* **34** (4): 749-762
- 78.- Saito M., Ckikuni K., Monma M. and Shimizu M. (1993). **Emulsifying and oil-binding properties of bovine serum albumin and its enzymatic hydrolyzate.** *Biosci. Biotech. Biochem.* **57** (6): 952-956
- 79.- Shewry P. R., Fido and Doonan S. (1996). **Methods in molecular biology. vol. 59. "Protein purification protocols"**. Edired by Doonan Shawn. Human Press. U.S.A.
- 80.- Shewry P. R., Franklin J, Parmar S, Smith S.J and Mifflin B.J. (1983). **The effects of sulphur starvation on the amino acid and protein composition of barley grain.** *J. Cereal Sci.* **1**: 21-31
- 81.- Siu N. Ch., Ma Ch. Y., Mock W. Y., and Mine Y. (2002). **Functional properties of oat globulin modified by a calcium-independent microbial transglutaminase.** *J. Agric. Food Chem.* **50**: 2666-2672
- 82.-Smith A. K. and Circle S. J. (1972). **Soybeans: Chemistry and Technology.** Ed. Avi. U. S. A.
- 83.- Soulie S., Denoroy L., le Caer J. P., Hamasaki N., Groves J. and le Maire M. (1998). **Treatment with crystalline ultra-pure urea reduces the aggregation of integral membrane proteins without inhibiting n-terminal sequencing.** *J. Biochem.* **124**: 417-420

- 84.- Tai S., Wu L., Chen E. and Tzen J. (1999). **Molecular cloning of 11S globulin and 2S albumin, the two major seed storage proteins in sesame.** *J. Agric. Food Chem.* **47**: 4932-4938
- 85.- Tasneem R. and Prakash V. (1989). **The nature of the unhydrolysed fraction of alpha-globulin, the major protein component of *Sesamum indicum* L. hydrolysed by alpha-chymotrypsin.** *J. Prot. Chem.* **8** (2):, 251-261
- 86.- Tasneem R. and Prakash V. (1992). **Resistance of α -globulin from *Sesamum indicum* L. to proteases in relationship to its structure.** *Indian. J. Biochem. Biophys.* **29**. (2): 160-167
- 87.- Tecson Mendoza E., Adachi M., Bernardo A. and Utsumi S. (2001). **Mungbean (*Vigna radiata* (L.) wilczekj) globulins: Purification and characterization.** *J. Agric. Food Chem.* **49**: 1552-1558
- 88.- Utsumi S., Ddamodaran S., and Kinsella J. E. (1984). **Heat induced interactions between soybean proteins: preferential association of 11S basic subunits and β -subunits of 7S.** *J. Agric. Food Chem.* **32**: 1406-1412
- 89.- Vasco-Méndez N. L., Soriano-García M., Moreno A., Castellanos-Molina R. and Paredes-López O. (1999). **Purification, crystallization, and preliminary x-ray characterization of a 36 kDa amaranth globulin.** *J. Agric. Food Chem.* **47**: 862-866
- 90.- Velásquez M. 1982. **Efecto de los niveles de fertilización (npk) y densidad de siembra en el ajonjolí (*Sesamum indicum*) sobre el rendimiento, contenido de proteína, cantidad y calidad de aceite.** Tesis Profesional. UACH. México.
- 91.- Wagner, J. R. and Gueguen J. (1999). **Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin.1. Foaming properties.** *J. Agric. Food Chem.* **47** (6): 2173-2180
- 92.- Wagner, J. R. and Gueguen J. (1999). **Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin. 2. Emulsifying properties.** *J. Agric. Food Chem.* **47** (6): 2181-2187
- 93.- Yuno-Ohta N., Okada M. and Hasegawa K. (1992). **Formation of transparent gels of sesame 13S globulin: Effects of fatty acid salts.** *J. Food Sci.* **57** (1): 86-90
- 94.- Zayas J. F. (1994). **Corn germ protein: functional properties in a model system and in food products.** *Biotech. Agric. Forestry.* **25**: 513-535

13.0 Anexos.-

Anexo I.-

Cuadro anexo I.- Composición porcentual de los residuos aminoácidos según lo reportado como los requerimientos diarios de los mismos, para adultos sanos por la FAO/WHO/OMS (22)

	%
Lisina	5.8
Treonina	3.4
Valina	3.5
Isoleucina	2.8
Leucina	6.6
Triptofano	1.1
Cisteina	—
Metionina	—
(Total azufrados)	2.5
Tirosina	—
Fenilalanina	—
(Total aromáticos)	6.3
(Total esenciales)	32.0

Anexo II.-

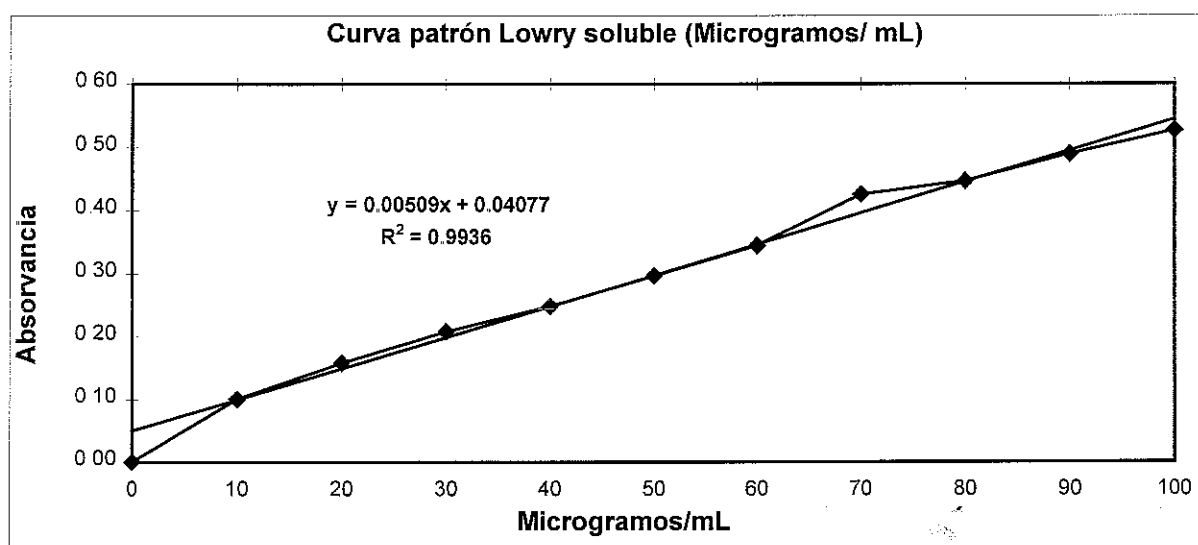


Figura anexo II.A. Curva patrón de albúmina sérica bovina para la técnica de Lowry-SDS (68).

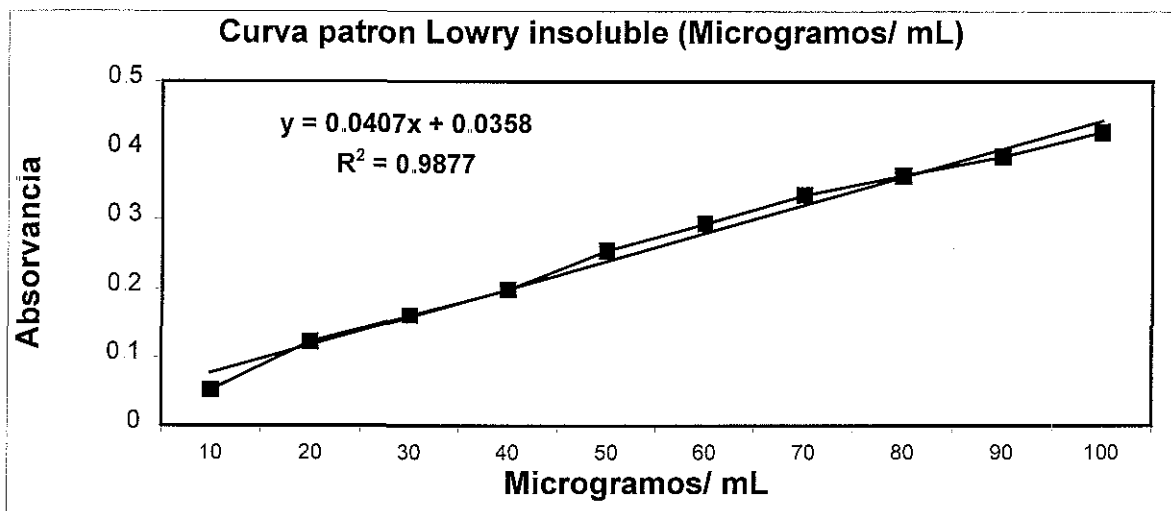


Figura anexo II.B. Curva patrón de caseína para la técnica de Lowry-SDS (68), modificada para muestras insolubles (28).

Anexo III.-

Cuadro anexo III. Comportamiento de solubilidad del aislado al variarse el pH entre 2 y 12. Se reporta el % de proteína soluble. La curva patrón se realizó con albúmina sérica bovina.

pH	mg /mL proteína soluble	Disolución (%)	Proteína Soluble (%) (g Proteína Soluble/ 100 g Aislado proteínico)
2	8.66	86.59	68.16
3	9.29	92.87	73.11
4	6.93	69.28	54.54
5	2.85	28.47	22.41
6	1.36	13.60	10.71
7	0.77	7.71	6.07
8	1.35	13.47	10.60
9	4.37	43.66	34.37
10	7.35	73.52	57.88
11	13.17	131.72	103.69
12	12.76	127.60	100.44

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Anexo IV.-

Cuadro anexo IV. Estabilidad de emulsión para un aislado comercial de soya, Ardex F® recomendado por el fabricante (ADM Protein Specialties®) como emulsificante alimenticio. Concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0% (p/v) de proteína. Se mantuvo el volumen de aceite inicialmente adicionado, constante y en 25% v/v.

Proteína (%)	Estabilidad de Emulsión (%)
0.1	72.78
0.5	100
1.0	100
5.0	100

Anexo V.-

En este anexo se presentan las dos secuencias aminoácidas reportadas para albúmina 2S de ajonjolí (*Sesamum indicum*):

1.- Tai S. S., et al. 1999.-

Definición: 2S albumin precursor [*Sesamum indicum*].

Número de acceso: AAD42943

Autores: Tai, S. S., Wu, L. S., Chen, E. C. and Tzen, J. T.

Titulo del artículo: Molecular cloning of 11S globulin and 2S albumin, the two major seed storage proteins in sesame

Revista: J. Agric. Food Chem. 47 (12), 4932-4938 (1999)

1 **marftivlav lfaaalvsas ahktvttsv aeegeeenqr gcwesrqcq
mrhcmqwmrs**
61 **mrgqyeesfl rsaeanqqgf ehfreccnel rdvkshcrce alrcmmrqmq
qeygmeqemq**
121 **qmqqmmqylyp rmcgmsypte crmrpifa**

2.- Pastorello E. A., et al. 2001.-

Pastorello E. A., Varin E., Farioli L., Pravettoni V., Ortolani C., Trambaioli Ch., Fortunato D., Giuffrida M. G., Rivolta F., Robino A., Calamari A. M., Lacava L. and Conti A. (2001).

The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin.

J. Chromat. B. 756: 85-93

psqqd ardlprrcnmrpqqcaf cnmrpqq