

TESIS PREMIADA ESCUELA QUIMICA: Segundo Lugar. **AISLAMIENTO Y TERMOESTABILIDAD DE LOS INHIBIDORES DE TRIPSINA
DEL FRIJOL NEGRO (*P. vulgaris*)**Julieta Eugenia Ortiz Chacón¹
Omar Dary Mansilla²**I. SUMARIO**

En el presente trabajo se aislaron los inhibidores de tripsina del frijol negro (*P. vulgaris*) y se evaluó su estabilidad térmica. Los inhibidores fueron aislados por cromatografía de afinidad, obteniéndose, para los dos ensayos realizados, 0,0020 y 0,0029 g de inhibidos, con factores de purificación de 71.42 y 67.61, respectivamente. El producto obtenido fue sometido a electroforesis, determinándose que casi la totalidad de las proteínas presentes en el extracto original que no tenían actividad antitriptica, habían sido removidas en el producto aislado. Sin embargo, el patrón electroforético del producto obtenido no coincidió con el del extracto original. Para evaluar la estabilidad térmica se compararon las bandas electroforéticas obtenidas a partir de frijoles cocidos a presión atmosférica a 0, 30, 60, 90 y 120 min. Paralelamente se efectuó un ensayo de actividad antitriptica para las mismas muestras de frijol. Con ambos métodos, el electroforético (cualitativo) y el de competencia (cuantitativo) se determinó que a los 30 min. de cocción los inhibidores de tripsina habían sido ya destruidos.

Del trabajo realizado se concluyó que los inhibidores de tripsina del frijol negro (*P. vulgaris*) son múltiples, aislándose 7 bandas con comportamiento electroforético distinto y que los inhibidores de tripsina son inestables a un tratamiento de cocción a presión atmosférica a partir de 30 min.

II. INTRODUCCION

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es la semilla de leguminosa más consumida en América Latina, y constituye uno de los principales proveedores de

proteína para gran parte de la población (1).

A pesar de que las leguminosas contienen 2-3 veces más proteína que los cereales (2), su digestibilidad proteínica es baja. Además, su contenido de amino ácidos azufrados es bajo y poseen sustancias antinutricionales o tóxicas (3). Entre estas sustancias, las más estudiadas son los inhibidores de tripsina, que son proteínas que forman complejos estequiométricos con la enzima inhibiendo competitivamente su función catalítica (4, 5).

Un proceso adecuado de cocción aumenta la digestibilidad de proteínas (6, 7, 8,). Este mejoramiento puede ser atribuido, entre otros factores, a la destrucción de inhibidores de tripsina. Sin embargo en algunos inhibidores de tripsina es posible, por cromatografía de afinidad, separar sus formas presentes y evaluar su estabilidad al calor.

III. MATERIALES Y METODOS**MATERIALES.**

Se utilizaron frijoles negros (*P. vulgaris*) variedad Ostúa cosechados en la Finca experimental de INCAP en diciembre de 1991.

EXTRACCION DE INHIBIDORES:

El frijol crudo fue molido a un mesh de 60. De la harina obtenida se pesaron 20g en duplicado y se extrajeron con 200 ml de agua destilada. El extracto fue centrifugado y filtrado.

PREPARACION DE COLUMNA TRIPSINA-SEFAROSA El procedimiento para inmovilizar tripsina en sefarosa activada se efectuó de acuerdo al manual de Pharmacia Fine Chemicals de Cromatografía de Afinidad (11), partiendo de 10 g de Sepharosa 4B

¹Licenciada en Química.²Licenciado en Biología, Doctor en Bioquímica, Jefe del Area de Sistemas Alimentarios, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá.

activada con Bromuro de Cianógeno (Sigma).

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD: 150 ml de extracto fueron pasados por la columna de afinidad a un flujo de aproximadamente 60 ml/hr de acuerdo a la técnica descrita por Chan y Lumen (12).

DETERMINACION DE PROTEINA: La presencia de proteína en todas las fracciones eluidas de la columna y la cuantificación del porcentaje de proteína del producto de la cromatografía se determinaron de acuerdo al método de Bradford (13).

DETERMINACION DE ACTIVIDAD INHIBIDORA: La presencia de actividad antitriptica en las fracciones eluidas con KCl 0.1 M pH 2 y la medición de dicha actividad en frijoles cocidos a 0, 30, 60, 90 y 120 min. Se efectuó de acuerdo al método de Liu y Markakis (14).

DIALISIS: Las sales presentes en la fracción conteniendo inhibidores de tripsina fueron eliminadas por diálisis contra agua destilada.

ELECTROFORESIS: Para la determinación del grado de pureza de la muestra y para la separación de los inhibidores presentes se llevó a cabo una electroforesis discontinua en condiciones nativas de acuerdo a la técnica descrita de Davis (15) utilizando un gel concentrado al 3% de acrilamida y un gel separador al 7.5% de acrilamida.

TINCION DEL GEL: La tinción cromática para revelar los inhibidores de tripsina en el gel de electroforesis se hizo por la técnica de Uriel y Berges (16) con las modificaciones realizadas por Koepe y colaboradores (14). Las bandas de proteína se revelaron por tinción con Coomassie.

TERMOESTABILIDAD: Se tomaron 5 muestras de 20g de frijol crudo en duplicado. Luego se sometieron a cocción a 96°C y presión atmosférica por 0, 30, 60, 90 y 120 min. Las muestras fueron enfriadas inmediatamente y liofilizadas. Se pesó 1 g del liofilizado y se extrajo con 10 ml de agua destilada por 2 hr. Los extractos se sometieron a electroforesis revelándose únicamente las bandas con actividad inhibidora. Se compararon las bandas obtenidas a partir

de los 5 tiempos de cocción para determinar si alguna de las bandas había desaparecido y el tiempo de cocción al cual se llevaba a cabo dicha destrucción.

La termoestabilidad también fue evaluada cuantitativamente por medición de actividad antitriptica en los extractos de acuerdo a la técnica espectrofotométrica de Liu y Markakis (17).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD: La curva obtenida de la separación de los inhibidores de tripsina por cromatografía de afinidad para los dos ensayos realizados, se presenta en la figura 1. Los picos de inhibición para las fracciones 50-75, se presentan junto a los picos de proteína, en las figuras 2,3. De la fracción con actividad antitriptica obtenida por cromatografía de afinidad, dializada (para remover sales) y liofilizada, se obtuvieron 0.0020 y 0.0029 g de producto. Los datos de la purificación aparecen en el cuadro 1.

ELECTROFORESIS: El producto de la cromatografía de afinidad se corrió junto al extracto original, obteniéndose los patrones electroforéticos que se presentan en la figura 3. Los geles obtenidos fueron revelados por tinción cromática (bandas claras, fondo oscuro), que muestra únicamente las bandas con actividad antitriptica y por tinción con Coomassie (bandas oscuras, fondo claro), que muestra las bandas correspondientes a proteína.

TERMOESTABILIDAD: Los valores obtenidos de actividad antitriptica medida de acuerdo a la técnica espectrofotométrica de Liu y Markakis para los frijoles sometidos a 0, 30, 90 y 120 min. De cocción. Se observa el mismo patrón electroforético del extracto, obtenido en los geles anteriores teñidos por actividad (fig. 3), para el tiempo de 0; mientras que para los tiempos de 30, 60, 90 y 120, no se obtuvieron bandas de inhibición.

El factor de purificación obtenido en promedio fue de 69.52. Por la técnica de cromatografía de afinidad, Rayas Duarte y colaboradores reportaron un factor de 13.8 en la purificación de inhibidores de tripsina a partir de frijoles blancos (18). Whitaker y Sgarbieri reportaron un factor de 60.1 en la purificación de inhibidores de

tripsina de frijoles rosados brasileños (en una primera aplicación a la columna) (1). Wu y Whitaker reportaron un factor de 30.8 en la purificación de inhibidores de tripsina de frijoles riñón (19).

El rendimiento de la purificación realizada fue baja debido a que la columna fue cargada con un exceso de extracto original.

A partir de el método de separación de inhibidores de tripsina por cromatografía de afinidad se obtuvo un producto con alto grado de pureza a juzgar por la comparación entre las proteínas del extracto contra las proteínas del producto obtenido. Todas las proteínas que están presentes en el extracto (fig. 3) pero que no tienen actividad antitriptica no se observan en el producto, a excepción de una muy débil que no entra al gel de separación. Esta banda fue observada también en una muestra patrón de inhibidor puro de soya obtenida de Laboratorios Sigma. Otros investigadores han observado bandas similares después de purificar por cromatografía de afinidad los inhibidores de tripsina de distintos materiales (1, 18, 20). Estas bandas carecen de actividad antitriptica y podrían deberse a adsorciones inespecíficas de proteínas de alto peso molecular, o a asociaciones o polimerizaciones de los inhibidores de bajo peso molecular produciendo moléculas mayores que pierden su actividad (1, 20). Las cantidades de inhibidor obtenidos, (0.0020 y 0.0029 g para la 1a y 2a cromatografía, respectivamente) fueron insuficientes para una subsecuente purificación.

La fracción de inhibidores de tripsina del producto de la cromatografía es múltiple, a juzgar por los resultados obtenidos en electroforesis discontinua, notándose que se separa en 6 bandas con actividad antitriptica. La presencia de varios iso-inhibidores en distintos materiales ha sido ampliamente documentada. Por ejemplo, la fracción de inhibidores de tripsina de las semillas de amaranto contiene 13 iso-inhibidores (10); la de frijol blanco, 11 (18); la de soya, frijol alado y frijol rosado, 8 (12, 21, 22); la de frijol lima, 6 (23); la de frijol riñón, 4 (19) y la de frijol pinto y lenteja, 2 (24), 25). Se ha observado que los inhibidores de tripsina de bajo peso molecular pueden asociarse entre sí (5, 18, 20, 26, 27) produciendo dímeros, trímeros o tetrameros, lo que complica la estimación del número de formas

presentes ((28). El patrón electroforético del inhibidor de tripsina obtenido por cromatografía difiere al del extracto original. Estos resultados podrían indicar que los inhibidores de tripsina presentes originalmente en el extracto fueron modificados en el proceso de purificación utilizado. La posibilidad de que haya ocurrido una proteólisis de los inhibidores por la tripsina presente en la columna es una explicación para dicha modificación. Estos resultados concuerdan con otras publicaciones en las que se reportan modificaciones de los inhibidores de tripsina por digestión enzimática durante el proceso de purificación (17, 25, 26). Las bandas débiles obtenidas después de la cromatografía podrían significar que una porción de los componentes iniciales probablemente sufrió alguna modificación en su estructura con la consecuente disminución de actividad.

En cuanto a estabilidad, ambas técnicas, la espectrofotométrica y la electroforética, indican que los inhibidores de tripsina del frijol negro de la variedad estudiada fueron inestables a una cocción de 30 minutos. Hamza y colaboradores no encontraron bandas electroforéticas con actividad inhibitoria en preparaciones de habas cocidas (29). Otros investigadores han reportado una reducción substancial de actividad antitriptica en frijoles remojados y cocinados por 30 minutos (18, 30, 31). Mueller y Weder aislaron inhibidores de tripsina a partir de lentejas. Ellos observaron que los inhibidores puros presentaban estabilidad térmica: sin embargo, no detectaron ninguna actividad antitriptica al analizar las lentejas cocinadas por tratamientos convencionales (24).

Al comprobarse que en frijoles cocidos, los inhibidores no ejercen actividad contra la tripsina, su efecto como agentes antinutricionales es anulado. Estos compuestos podrían más bien ser beneficiosos por su alto contenido de cistina (2, 6, 25, 32, 33). Siendo los frijoles deficientes en amino ácidos azufrados, las variedades con altos contenidos de inhibidores de tripsina podrían contrarrestar dicha deficiencia, mejorando así la calidad nutricional de estas semillas. Por otro lado, su papel de defensa para la planta, contra ataques de insectos y microorganismos, podría aprovecharse desde el punto de vista de mejoramiento genético para producir especies más resistentes.

FIG. 1. PERFIL DE ELUCION DE INHIBIDORES I y II CROMATOGRAFIAS DE AFINIDAD

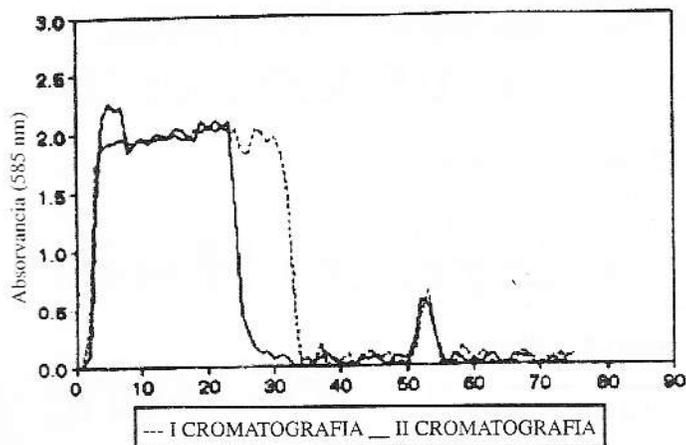


FIG. 2. ELUCION CON KCl 0.1M pH 2 I y II CROMATOGRAFIAS DE AFINIDAD

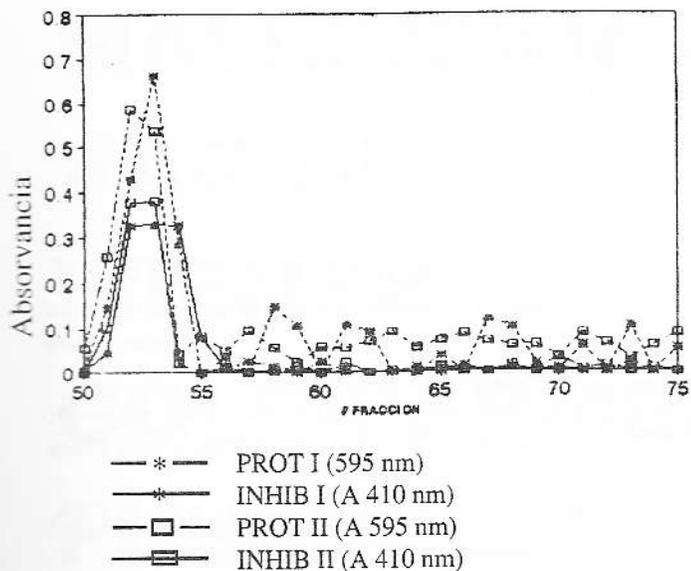
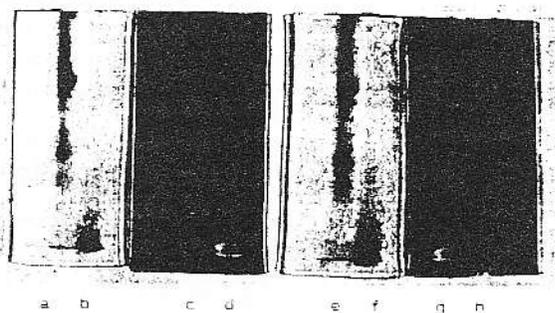


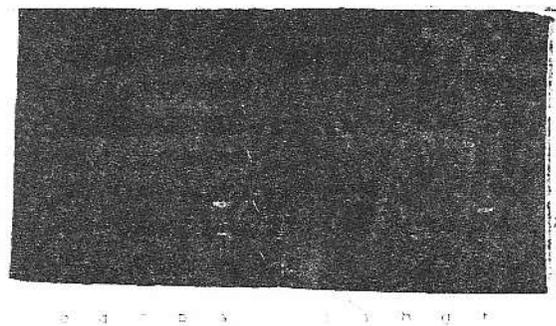
Fig. 3. ELECTROFORESIS DISCONTINUA DE EXTRACTO Y PRODUCTO DE CROMATOGRAFIA

a extracto I, tinción proteína: b producto I, tinción proteína: c extracto I, tinción actividad: d producto I, tinción actividad: e extracto II, tinción proteína: f producto II, tinción proteína: g producto II, tinción actividad: h extracto II, tinción actividad.



Donde UII= incremento de 0.001 en unidades de absorbancia a 410nm.

Fig. 4. BANDAS DE INHIBICION DE FRIJOLAS COCIDAS 0, 30, 60, 90 Y 120 MINUTOS A PRESION ATMOSFERICA



a muestra 1, 0 min: b muestra 1, 30 min: c muestra 1, 60 min: d muestra 1, 90 min: e muestra 1, 120 min; f muestra 2, 0 min: g muestra 2, 30 min; h muestra 2, 60 min; i muestra 2, 90 min; j muestra d, 120 min.

Cuadro 1. Datos de la Purificación de los Inhibidores de Tripsina de frijol negro (*P. vulgaris*)

Muestra	Peso total (mg)	Proteína total (mg)	Actividad Antitriptica (UTI/mg)	Actividad Antitriptica (UTI)	Actividad Especifica total (UTI/mg p)	Factor de (%)	Rendimiento Purificación
Extracto I	20032.00	3193.10	122.5	2453920.00	768.51	1	100.00
Producto I	2.00	0.22	6037.5	12075.00	54886.36	71.42	0.49
Extracto II	200400.00	3222.43	126.4	2533056.00	786.07	1	100.00
Producto II	2.90	0.27	4948.3	14350.01	53148.19	67.61	0.57

Cuadro 2. Actividad antitriptica de frijoles cocidos a 0, 30, 60, 90 y 120 min. A presión atmosférica.

Tiempo de cocción (min)	Actividad Antitriptica (UTI/mg)
0	124.45
30	n.d. ¹
60	n.d.
90	n.d.
120	n.d.

¹no detectada**AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá por toda la ayuda técnica y financiera, que hizo posible la realización de este trabajo.

IV. REFERENCIAS

- Whitaker JR, Sgarbieri VC. Purification and Composition of the Trypsin-Chymotrypsin Inhibitor of *Phaseolus vulgaris* L. var rosinha G2. *J Food Biochem* 1981;5:197-213.
- Liener IE. Legume Toxins in Relation to Protein Digestibility, A. Review. *J Food Sci* 1976;41:1078.
Peace RW, et al. Effects of Storage on Protein Nutritional Quality of Grain Legumes. *J Food Sci* 1988;53:439.
- Chitra R, Sadasivam S. A. Study of the Trypsin Inhibitor of Black Gram. *Food Chem* 1986;21:315-320.
- Richardson M. Protein Inhibitors of Enzymes. *Food Chem* 1980;6:235-253.
- Sgarbieri VC, Whitaker JR. Protein of Digestive Enzymes. *Ady Food Res* 1982;28:128-166.
- Desphande SS, Nielsen SS. In vitro Enzymatic Hidrólisis of Phaseolin, the Major Storage Protein of Phaseolus Vulgaris L. *J Food Sci* 1987;52:1326.
- Khalil AH, Mansour Eh. The Effect of Cooking, Autoclaving and Germination on the Nutritive Quality of Faba Beans. *Food Chem* 1995;54:180.
- Richardson M. The Proteinase Inhibitors of Plants and Microorganisms. *Phytochemistry* 1977;16:159-169.
- Koeppel SJ, et al. Isolation and Heat Stability of Trypsin Inhibitors in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*). *J Food Sci* 1985;50:1519-1521.

DILAB S.A.

EQUIPO Y SUMINISTROS PARA LABORATORIO CLINICO E INDUSTRIAL

SARTORIUS

HACH

PETRIFILM

MALLINCKRODT

VARIAN

WIENER

COLE-PARMER

FISHER

- Sistemas de Filtración por Cartucho y Membrana
- Equipos para Análisis de Agua
- Desionizadores y Destiladores
- Análisis Microbiológico de alimentos, ambientes y superficies
- Químicos y Reactivos Calidad HPLC, AA, Pesticidas, CG
- Espectrofotómetros UV-V
- Absorción Atómica, HPLC y Cromatógrafos de Gases
- Medios de Cultivo
- Reactivos Clínicos
- Campanas de Flujo laminar vertical y horizontal
- Cristalería y Plásticos
- Agitadores, Rotadores Centrífugas y más !

**20 años de experiencia y servicio
equipando laboratorios**

12 calle 3-31 zona 1
PBX: 2518650 FAX: 2538383
Apartado Postal 2925
E-mail: dilab@quate.net

**Próximamente en zona 10
10 calle 5-43**