



UNIVERSIDAD DE SONORA

MAESTRIA EN CIENCIAS ESPECIALIDAD
ALMACENAMIENTO Y PROCESAMIENTO DE GRANOS

EL SABER DE MIS HIJOS
HARA MI GRANDEZA

1026
1457
RIS-423

Aislamiento y Caracterización Parcial de Lectinas de Diferentes Variedades
de Frijol (*Phaseolus vulgaris*) Tipo Pinto

TESIS

que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

presenta:

JOSE LUIS CARDENAS LOPEZ



Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	5
REVISION DE LITERATURA.....	6
Las Lectinas del Frijol.....	6
Propiedades Bioquímicas.....	9
Funciones en las Plantas.....	12
Localización de las Lectinas.....	14
Aislamiento y Purificación de Lectinas de Frijol.....	15
Metodos de Detección de las Lectinas.....	18
Efectos Nutricionales de las Lectinas.....	20
Estabilidad de las Lectinas.....	21
Modificaciones Genéticas de las Lectinas.....	22
MATERIALES Y METODOS.....	25
Preparación de la Muestra.....	25
Extracción de Proteína.....	25
Determinación de Proteína en Solución.....	25
Fraccionamiento con Sulfato de Amonio.....	26
Filtración en Gel	27
Cromatografía de Afinidad.....	28

Detección de Actividad Hemaglutinante.....	29
Electroforesis.....	30
RESULTADOS Y DISCUSION.....	32
Fraccionamiento con Sulfato de Amonio.....	32
Filtración en Gel	32
Cromatografía de Afinidad.....	34
Variedad Pinto UI111	35
Variedad Amber	37
Variedad Agate.....	37
Variedad Columbia.....	41
Variedad NW410.....	41
Electroforesis.....	53
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
BIBLIOGRAFIA	59



LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Efectos biológicos de las lectinas.....	10
2. Actividad hemaglutinante y específica de fracciones proteicas de frijol variedad Pinto UI111 precipitadas con sulfato de amonio.....	33
3. Recuperación de proteína en las fracciones con actividad hemaglutinante de las diferentes variedades de frijol purificadas mediante cromatografía de afinidad en fetuina-agarosa.....	36
4. Purificación de lectinas de frijol variedad Pinto UI111	38
5. Purificación de lectinas de frijol variedad Amber.....	39
6. Purificación de lectinas de frijol variedad Agate.....	40
7. Purificación de lectinas de frijol variedad Columbia.....	42
8. Purificación de lectinas de frijol variedad NW410.....	43





LISTA DE FIGURAS

Página

Figura

1. Representación esquemática de las Isolectinas del frijol común16

2. Cromatograma de extracto crudo de frijol Pinto UI111 en fetuína-agarosa.....45

3. Cromatograma de extracto crudo de frijol Amber en fetuína-agarosa.....46

4. Cromatograma de extracto crudo de frijol Agate en fetuína-agarosa.....47

5. Cromatograma de extracto crudo de frijol Columbia en fetuína-agarosa.....48

6. Cromatograma de extracto crudo de frijol NW 410 en fetuína-agarosa.....49

7. Actividad específica de extractos crudos de diferentes variedades de frijol.....50

8. Actividad específica de fracciones separadas mediante cromatografía de afinidad en fetuína-agarosa de diferentes variedades de frijol.....52

9. Patrón electroforetico de extractos crudos de las variedades de frijol utilizadas y las lectinas purificadas mediante cromatografía de afinidad en fetuína - agarosa.....55

RESUMEN

Se aislaron lectinas de cinco variedades de frijol, todas ellas emparentadas genéticamente con Pinto UI111, cuya actividad hemaglutinante ha sido reportada como leve. Para su aislamiento se utilizó precipitación con sulfato de amonio, filtración en gel y cromatografía de afinidad en fetuína-agarosa . Los mejores resultados se obtuvieron mediante el empleo de cromatografía de afinidad utilizando fetuína agarosa, ya que es se empleó un solo paso de purificación. Se obtuvieron las fracciones donde residía la totalidad de la actividad hemaglutinante detectable de cada una de las variedades utilizadas. Estas fracciones aisladas tuvieron diversos grados de actividad hemaglutinante, todas ellas superiores al progenitor Pinto UI111. Los patrones electroforéticos obtenidos de los extractos crudos de las variedades mostraron similitud en las bandas principales y la presencia de una banda en las fracciones con actividad hemaglutinante en la variedad Amber. Se concluyó que las variedades en estudio, a pesar de poseer un progenitor común presentan diferencia en actividad, tanto de sus extractos crudos como de sus lectinas aisladas, y que no existe correspondencia entre la actividad de los extractos crudos y el de las lectinas ya aisladas.

Las leguminosas, principalmente el frijol, contribuyen en forma especial en la dieta de personas que no están en condiciones de consumir leche y otros productos de origen animal (Carpenter, 1981).

En algunas partes del mundo, las leguminosas, han reemplazado parcial o totalmente a los productos animales, como fuente de proteína, mientras que en otros países se han mantenido como fuente de proteína suplementaria (Bressani y Elías, 1974). En general, se considera a las leguminosas como las mejores fuentes de proteína en países en vías de desarrollo, por su bajo costo y tomando en cuenta que suplementados con cereales proveen un buen balance de aminoácidos (Salunkhe y colaboradores, 1985).

En algunos países el consumo de leguminosas comienza desde la temprana infancia, principalmente en forma de caldos o sopas, mientras que en otros se empieza a hacer énfasis en su uso, utilizandolas como proteína aislada (Bressani y Elías, 1974). En un futuro las proteínas de leguminosas podrán tener una mayor importancia, desde el punto de vista nutricional, por su bajo precio y versatilidad. Sin embargo, este potencial nutricional de las leguminosas está limitado por su baja digestibilidad, bajo

contenido de aminoácidos azufrados y la presencia de factores considerados como tóxicos y/o antinutricionales, tales como: Inhibidores de proteasas, lectinas, compuestos formadores de bocio, compuestos cianogénicos, compuestos que producen favismo y lathirismo (Liener, 1979), oligosacáridos flatulentos, ácido fítico (Thorn y col., 1983), alérgenos, polifenoles, estrógenos, saponinas, antivitaminas y fitoalexinas (Salunkhe y col., 1985).

De los compuestos antinutricionales, el más importante, desde el punto de vista cuantitativo son las fitohemaglutininas o lectinas, ya que pueden representar del 8 al 10 % de la proteína total de la semilla de frijol (Murray, 1984). Las lectinas, al igual que otros factores antinutricionales son inestables al calor, por lo que se puede asumir que un correcto procesamiento para el consumo elimina o disminuye su actividad considerablemente (Grant y col., 1982; Thompson y col., 1983). Sin embargo, existe evidencia de que cierta actividad residual se mantiene en algunos productos de frijol y en frijol cocido y no se conoce si las lectinas desnaturalizadas pueden causar los efectos producidos por las lectinas nativas (Sgarbieri y Whitaker, 1982). Además, dada la diversidad de costumbres y utensilios utilizados para la preparación del frijol, no siempre hay buena correlación entre la textura adecuada para

su consumo y la eliminación de la actividad biológica de las lectinas (Sgarbieri y Whitaker, 1982); otro aspecto importante es que los efectos adversos producidos por las lectinas se acentúan cuando se incluyen en las dietas de animales experimentales con poblaciones altas de bacterias en el tracto intestinal, aunque todavía no se conoce el mecanismo con exactitud (Pusztai, 1989). No se conoce, además, el efecto a largo plazo del consumo de frijol en el cual cierta actividad residual de las lectinas pudiera estar presente (Sgarbieri y Whitaker, 1982).

En el mejoramiento genético del frijol, además de los aspectos agronómicos como el rendimiento, la resistencia a la sequía y a las plagas, entre otros, se deben tomar en cuenta los aspectos nutricionales, como lo son el aumento del aminoácido metionina y la eliminación de factores antinutricionales indeseables, tales como las lectinas. Para que los fitomejoradores puedan incluir los aspectos anteriores en la obtención de nuevas variedades se requiere de un estudio más detallado acerca de las funciones, la estructura, las propiedades físicas y bioquímicas de las lectinas presentes en las líneas y variedades de frijol que estos centros de fitomejoramiento y experimentación agrícola están evaluando constantemente para hacer recomendaciones a los agricultores en cuanto a su cultivo en la región.

En el presente trabajo se aislaron las lectinas de algunas variedades recientes de frijol tipo Pinto, mismo que es de alto consumo en la región; el aislamiento es el punto de partida de un estudio de las características de este compuesto en las diferentes variedades, para conocer el impacto que ha tenido el fitomejoramiento en ellas, y fundamentar desde el punto de vista toxicológico la selección de dichas variedades para que representen mejores opciones nutricionales.

En la elaboración de este trabajo se siguió el formato de la revista Journal of Food Science.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

1. Conocer más acerca de la estructura de las lectinas de variedades de frijol de alto consumo en la región.

Objetivos Particulares

1. La separación y purificación de las lectinas de las variedades de frijol Pinto UI111, Amber, Agate, Columbia y NW410
2. La caracterización parcial de las lectinas de las mismas variedades.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Las Lectinas de Frijol

La actividad hemaglutinante fué descrita inicialmente por Stillmark en 1888, causada por un componente de la semilla de higuierilla (Ricinus comunis); posteriormente, Elfstrand (1898), descubrió componentes con características similares en las semillas de las euforbiaceas Abrus precatorius y en Croton tiglum, llamándoles abrina y crotina, respectivamente, a los principios activos de estas semillas.

Después, en 1908, Landsteiner y Raubitscheck observaron que los extractos de diversas semillas comestibles de leguminosas también aglutinaban glóbulos rojos, pero la actividad relativa hemaglutinante de diversas semillas era diferente cuando se evaluaba con células sanguíneas de diferentes animales; en las investigaciones realizadas en esa época no se detectaron los efectos tóxicos de estos componentes (Jaffé, 1980). En 1915, Harris descubrió que los extractos de semilla de soya aglutinaban fuertemente a los eritrocitos; este componente fué aislado por primera vez en 1952 por Liener y Pallansch, y fué llamado soyina.

En 1954, Boyd y Sharpleigh acuñaron la palabra "lectina" (del latin legere = elegir, escoger) para

denominar a las sustancias de origen vegetal que aglutinan eritrocitos y muestran alta especificidad hacia eritrocitos humanos de diferentes grupos sanguíneos, así como de diferentes especies de animales (Liener, 1976).

Las propiedades antigénicas de las lectinas o fitohemaglutininas (como fueron también llamadas por su capacidad de aglutinar células sanguíneas) fueron estudiadas en los inicios del siglo por diversos investigadores y esto permitió sentar las bases de la inmunología moderna.

Por un tiempo se olvidó de la importancia de estos descubrimientos debido al desarrollo de antígenos de origen bacteriano, hasta que Renkonen (1948) detectó que los extractos de semillas de diversas leguminosas mostraban especificidad para los antígenos humanos de los grupos sanguíneos A, B y O (Toms y Western, 1971). Se comprobó después, que cierto número de éstas fitohemaglutininas eran específicas en sus interacciones con los glóbulos de la sangre de humanos de los grupos A, O, B, M y N (Gatehouse, 1984).

Las semillas de muchos vegetales comenzaron a ser probadas para detectar fitohemaglutininas que se pudieran utilizar para el tipo de sangre (Toms y Western, 1971).

Actualmente la palabra "lectina" se usa como término genérico que denota todas las proteínas que unen

específicamente azúcares; se les denomina fitolectinas a las de origen vegetal, zoolectinas a las de origen animal y micolectinas a las de microorganismos (Sgarbieri y Whitaker, 1982). Una definición más exacta desde el punto de vista operacional es la dada por Kocourek y Horejsi (1983), en la que definen a las lectinas como "proteínas de naturaleza no-inmunoglobulina capaces de reconocer específicamente y unirse reversiblemente a las fracciones carbohidrato de carbohidratos complejos sin alterar la estructura covalente de algunos de los ligandos glucosídicos reconocidos", esta definición excluye algunas toxinas y proteínas quimiotácticas que se unen sólo a azúcares simples (Eztler, 1985).

Tan amplio e importante es el estudio de éstas peculiares proteínas que se ha creado un nuevo campo: el de la "Lectinología"; actualmente se han aislado y caracterizado aproximadamente 100 lectinas, algunas superficialmente y otras con gran detalle (Van Driessche, 1988); en los últimos años se ha empezado a estudiar a las lectinas también desde el punto de vista de su importancia nutricional (Pusztai y col., 1981, 1982).

Propiedades Bioquímicas

Como su nombre lo indica, las hemaglutininas o lectinas se caracterizan y detectan por su acción en los glóbulos rojos de la sangre, pero también pueden ser aglutinadas otros tipos de células (Jaffé, 1980) debido a que prácticamente todas las células tienen una cubierta de azúcares en su membrana (Lis y Sharon, 1986). Las lectinas poseen una serie de propiedades biológicas que las convierten en herramientas útiles en la investigación biomédica, las cuales están resumidas en la Tabla 1.

Las lectinas son en su mayoría glucoproteínas, es decir, proteínas que poseen una fracción carbohidrato en su estructura; sin embargo, aparte de esto no hay una estructura común para todas ellas. Algunas de estas proteínas son ricas en ciertos aminoácidos, tales como ácido aspártico, treonina y serina, que pueden representar aproximadamente el 30 % del contenido total de aminoácidos; en contraste, son bajas o carentes de aminoácidos azufrados. El peso molecular de las lectinas fluctúa desde 36,000 D para la lectina de germen de trigo hasta 265,000 D para la lectina de frijol Lima (Lis y Sharon, 1986).

Tabla 1. Efectos Biológicos de las Lectinas

Aglutinación de eritrocitos u otro tipo de células.
Estimulación mitogénica de linfocitos.
Generación de células supresoras.
Mediación de la muerte de células-blanco por linfocitos y macrófagos.
Realce de la fagocitosis de levaduras y bacterias por macrófagos.
Efectos de Insulina con células grasas.
Toxicidad a células y animales.
Inhibición de crecimiento de tumores.
Inducción de la formación de vacuolas en macrófagos.
Efectos inmunosupresivos "in vivo".
Promoción de la adhesión y diseminación de células.
Inducción de la liberación de histamina de basófilos.
Inhibición de crecimiento de hongos.
Liberación de peróxido de macrófagos.
Inhibición de endocitosis de enzimas lisosomales de fibroblastos cultivados.



Todas las lectinas consisten de subunidades proteicas, siendo las de plantas compuestas de dos o cuatro; en la mayoría de las lectinas las subunidades son idénticas, pero en algunas pueden ser diferentes o en pares. Las subunidades de diferentes isolectinas de la misma fuente pueden ser intercambiadas (Lis y Sharon, 1981).

Salvo raras excepciones, todas las lectinas contienen metales. Se requiere Ca^{2+} y/o Mn^{2+} para su actividad (Lis y Sharon, 1981).

La estructura de la lectina de frijol común está formada por una familia de 5 isolectinas, las cuales están constituidas por un tetrámero de 4 subunidades unidas por enlaces no covalentes (Goldstein y Poretz, 1986).

De acuerdo al peso molecular de las subunidades, las lectinas de leguminosas son clasificadas generalmente en dos grupos : los de cadena sencilla y los de dos cadenas. Las primeras son dímeros o tetrámeros de un tipo de subunidades, mientras que en la última están construidas de dos diferentes tipos de subunidades que son llamadas la cadena α y la cadena β . Ambas cadenas están unidas por fuerzas no covalentes (Van Driessche, 1988).

Funciones de las Lectinas en las Plantas

Las lectinas representan del 2 al 10% del total de las proteínas en las semillas de leguminosas, lo cual sugiere que tienen un papel importante en la fisiología de la planta (Murray, 1984); por lo que se han formulado muchas hipótesis acerca de las funciones que podrían desempeñar.

La amplia distribución de las lectinas en las plantas y su habilidad de distinguir diferentes tipos de células, podría ser indicativo de que sirven para combatir las invasiones de organismos patógenos en las etapas de desarrollo en que la planta es más susceptible al ataque, esto es durante la imbibición, germinación y estado de plántula (Pusztai, 1989).

Las lectinas pueden servir también como sitios receptores para elicitores de fitoalexinas, y por lo tanto contribuir a la defensa de la planta contra patógenos (Vidhyasekaran, 1988).

Las lectinas actúan como anticuerpos para reconocer las bacterias nocivas del suelo e inhiben la formación de quitina en las hifas de los hongos fitopatógenos, inhibiendo también las polisacaridas de los mismos (Lis y Sharon, 1981).

Algunos autores sugieren que las lectinas protegen también de animales depredadores; se encontró que las larvas

del gorgojo Callosobruchus maculatus morían al agregar lectina de frijol negro en su dieta (Janzen y Liener, 1976).

Una función que ha sido extensamente estudiada es la interacción en el reconocimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo (Dazzo y Gardiol, 1984; Barondes, 1983; Bohlool y Schmidt, 1974). Otras funciones que han sido propuestas son : Actuar como proteínas de reserva (Murray, 1984); servir en el transporte y almacenamiento de los azúcares; adherir enzimas glucoproteicas en sistemas multienzimáticos y jugar un papel importante en el desarrollo y diferenciación de las células embrionarias (Sgarbieri y Whitaker, 1982).

Existen otras funciones posibles para las lectinas en las plantas, de las cuales existe todavía poca investigación, tales como el reconocimiento celular en la interacción pistilo-polen y participar en la elongación de la pared celular mediante las auxinas (Pusztai, 1989).

Muchas plantas contienen más de una lectina, y es posible que las plantas contengan familias de genes de lectina que han alterado su expresión en diferentes tejidos de la misma planta. A pesar de la cantidad de información acerca de la estructura y propiedades de las lectinas, su importancia biológica todavía no puede ser establecida; su diversidad en propiedades y distribuciones subcelulares en

diferentes tejidos de la misma planta sugiere que las lectinas se pueden haber adaptado para una gran variedad de funciones durante su evolución (Eztler, 1985).

Localización de las Lectinas

Con respecto a la formación de las lectinas en las semillas, se ha estudiado el mecanismo que se da en la planta "Horse gram" (Dolichos biflorus) y se ha encontrado que el contenido de lectinas aumenta repentinamente durante la formación de la semilla. No es detectable los primeros 26 días después de la floración y alcanza un máximo nivel a los 28 días (1000 ng de lectina/ μg de nitrógeno), así mismo, al germinar la semilla y hacer un extracto de tallos y hojas de la plántula, ésta contiene solamente pequeñas cantidades de lectina (Barondes, 1981). El patrón de la acumulación y desaparición de lectinas en las semillas sugiere que las lectinas funcionan durante la maduración y germinación de la semilla o en mantener la dormancia de la semilla (Eztler, 1985).

En muchas leguminosas la localización de las lectinas está principalmente en los cuerpos proteicos y también uniendo las membranas de estos cuerpos proteicos a los gránulos de almidón. Las isolectinas de frijol están

localizadas dentro de los cuerpos proteicos del parenquima de almacenamiento del cotiledón, pero en algunas células vasculares y en el parénquima del eje embrionario las lectinas son citoplásmicas (Murray, 1984).

Aislamiento y Purificación de Lectinas de Frijol

Las lectinas de frijol han sido aisladas por cromatografía de afinidad en columnas de Sefarosa conjugada con tiroglobulina porcina y con fetuina; ambas glucoproteínas unen a las lectinas (Goldstein y Poretz, 1982). Rigas y col. (1955, 1964) aislaron a partir del frijol "red kidney" lo que parecía una glucoproteína homogénea con peso molecular de 128,000 D con propiedades leucoaglutinantes y eritroaglutinantes; después se evidenció que las dos propiedades biológicas provenían de diferentes isolectinas, que después fueron llamadas E (eritroaglutinante) y L (leucoaglutinante). Miller y col. (1973) comprobaron que las lectinas del frijol "red kidney" están formadas por una familia de 5 isolectinas, y que éstas pueden ser separadas por cromatografía de intercambio iónico. Cada isolectina está formada por cuatro subunidades unidas por enlaces no covalentes, conteniendo diferentes proporciones de las subunidades E y L, según se muestra en la Figura 1.

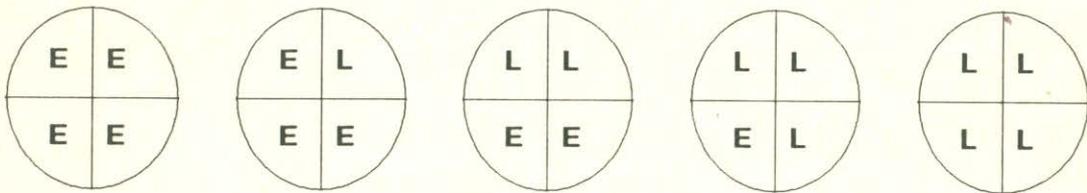


Figura 1. Representación esquemática de las Isoelectinas de frijol común.
E: fracción eritroaglutinante y L: fracción leucoaglutinante.
(Tomado de Millery cols., 1975).

La isolectina E_4 tiene una fuerte afinidad por los eritrocitos y la isolectina L_4 tiene una fuerte afinidad por los leucocitos, así como una potente actividad mitogénica de linfocitos. Las 3 formas intermedias (E_3L_1 , E_2L_2 , y E_1L_3) tienen diferentes grados de afinidad por los eritrocitos y los leucocitos.

Takahashi y col. (1967) purificaron una lectina de frijol "Wax" con propiedades similares a las del frijol "red kidney", esta lectina contenía los azúcares glucosa, arabinosa, fucosa, manosa, xilosa, y glucosamina.

Pusztai y Watt (1974) aislaron y caracterizaron 5 isolectinas de semillas de frijol Phaseolus vulgaris variedad "Processor" por cromatografía de afinidad en fetuína-Sefarosa.

Ohtani y Misaki (1979) purificaron una lectina de frijol "Tora" por cromatografía de afinidad utilizando tiroglobulina-Sefarosa y Concanavalina A-Sefarosa.

Novakova y Kokourek (1974) aislaron dos lectinas por técnicas convencionales en el frijol Phaseolus coccineus "Scarlet runner", siendo ambas glucoproteínas tetraméricas conteniendo iones metálicos Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , con un peso molecular de 120,000 D.

Pusztai y col. (1981) aislaron una lectina dimérica con baja actividad aglutinante en la variedad de frijol Pinto

111; esta lectina fué purificada por diversos métodos convencionales, incluyendo cromatografía de filtración en gel, fraccionamiento por solubilidad y electroforesis continua de alto voltaje. Se empleó también cromatografía de inmunoafinidad en una columna de Sefarosa 4B a la cual se ligaron inmunoglobulinas antilectina de semilla de frijol Pinto.

Los resultados mostraron que la lectina tuvo un peso molecular de 52,000 D.

Dada la importancia que tienen las lectinas purificadas como herramientas para infinidad de pruebas en la industria biomédica, cada vez son más los investigadores que se han dado a la tarea de buscar nuevas metodologías para su aislamiento y purificación.

Métodos de Detección de las Lectinas

Existen un gran número de métodos para cuantificar el grado de aglutinación ocasionado por lectinas bajo ciertas condiciones específicas.

La cuantificación del grado de aglutinación puede involucrar: conteo microscópico de células libres y células aglutinadas, uso de contador de partículas, conteo de eritrocitos que se adhieren a una capa celular cubierta de



BIBLIOTECA
D. I. P. A.

BIBLIOTECA
C C I Alimentos 19

lectinas o la determinación de células radio-etiquetadas adheridas a una capa celular.

Los métodos de titulación pueden involucrar la determinación del tiempo requerido para aglutinar aproximadamente el 50% de las células en una concentración dada de lectinas o la determinación de la concentración de lectinas requerida para aglutinar el 50 % de los eritrocitos a un tiempo dado (Schnebli, 1988).

Un método que es comúnmente utilizado por su sencillez es el método de microtitulación seriada que consiste en realizar diluciones en serie en una placa de microtitulación, añadiendo una concentración constante de eritrocitos tratados con proteasa y observar la aglutinación al cabo de una hora (Jaffé y Brucher, 1972).

En un intento por hacer más objetiva la cuantificación de lectinas, Liener (1955) desarrolló una técnica espectrofotométrica, en la cual se mide la densidad óptica de la capa de eritrocitos tripsinizados no sedimentados en un tiempo de incubación de 2.5 horas, la actividad hemaglutinante es calculada de éstas mediciones. Sin embargo, la técnica consume demasiado tiempo y los resultados tienen un amplio margen de error (Bender, 1982).

El manejo de la suspensión de eritrocitos, así como la densidad de células, las variaciones en temperatura, el

tiempo de reacción, el pH y el ambiente iónico son condiciones que influyen en la aglutinación de las células por las lectinas (Schnebli, 1988).

La medición de actividad hemaglutinante de muestras de frijol no debe ser tomada categóricamente como una medición del contenido de lectinas, ni como una medición de la posible toxicidad producida por éstas, sino únicamente como un indicador de su presencia en el frijol (Barrón, 1984).

Efectos Nutricionales de las Lectinas

En reseña de Liener (1986), se indica que las lectinas de frijol pueden agruparse básicamente en cuatro tipos:

a) Aquellas que aglutinan células de conejo y células tripsinizadas de vaca; b) Las que aglutinan solo células de conejo; c) Las que aglutinan sólo células tripsinizadas de vaca y d) Aquellas que aglutinan solo células tripsinizadas de roedores Hamster. Se ha encontrado que sólo los tipos correspondientes a los incisos a y c son tóxicos al inyectarse a ratones, así mismo son las que retardan más el crecimiento de ratas. Liener (1974) ha reportado que al administrar niveles bajos hasta de 0.5 % de lectinas en la dieta de ratas, se observa un retardo en el crecimiento.

Se piensa que el modo de acción de las lectinas tiene

que ver con su afinidad por compuestos presentes en las membranas del intestino, lo que causa una interferencia no específica con la absorción de nutrientes (Jaffé, 1980).

Rouanet y col. (1982) encontraron que la adición de lectina purificada en la dieta de ratas inhibió la invertasa del intestino, por lo que la digestibilidad de las proteínas y la hidrólisis de azúcares se reducen. La lectina de Phaseolus vulgaris afectó fuertemente la actividad enteroquinasa del duodeno de ratas "in vitro", por lo que se cree que las lectinas de frijol interfieren con la proteólisis en el tracto digestivo (Rouanet y col., 1983).

Estabilidad de las Lectinas

La forma de consumo del frijol es generalmente después de un cocimiento, lo cual destruye la actividad de la lectina (Coffey y col., 1985; Thompson y col., 1983; Grant y col., 1982) pero, en los últimos años se ha hecho énfasis en el uso de harinas instantáneas, las cuales a veces tienen un tratamiento térmico insuficiente para destruir totalmente la actividad hemaglutinante (Bender y Reali, 1982). Se considera en forma general que el cocimiento de esta leguminosa para el consumo humano es casi una garantía para la inactivación de éste factor tóxico, pero debe prestarse

condiciones de procesamiento moderno; por ejemplo, en mezclas con cereales para comidas de infantes, donde a veces el tratamiento térmico es insuficiente (Liener, 1981). Se puede seguir detectando una actividad biológica residual en algunos tipos de frijol y subproductos de frijol dependiendo de la forma en que se cocinen, ya que existe una gran diversidad de sistemas de cocinado en las diferentes culturas; se desconoce aún la magnitud de ésta actividad residual y se desconoce también si las lectinas desnaturalizadas aún tienen capacidad de adherirse a las mucosas, causando rompimiento de las membranas de las microvellosidades y degradación celular (Sgarbieri y Withaker, 1982).

Modificaciones Genéticas del Contenido de Lectinas

La lectina es una proteína que es heredada como un carácter dominante monogénico, por lo que puede ser susceptible de manejo fitogenético (Klozova y Turkova, 1978).

En un experimento de este tipo, Osborn y Bliss (1985) emplearon retrocruza para eliminar el contenido de lectina en semillas de frijol y estudiar los efectos, utilizando las variedades Pinto UI140 y Pinto 111 como padres sin lectina y "Sanilac" y "Great Northern" como padres con lectina. Los resultados mostraron que no se alteraron las cualidades

agronómicas del frijol y que las líneas obtenidas sin lectina substituyeron su contenido proteico de lectina por la proteína faseolina, lo cual puede ser importante ya que en la fracción faseolina es mayor en contenido de los aminoácidos azufrados.

En un estudio reciente de la variabilidad de proteínas en diferentes variedades de frijol, se encontró que existen diferencias y polimorfismo tanto entre variedades como dentro de una misma variedad (Klozova y Turkova, 1978).

Algunas semillas de Phaseolus vulgaris han sido reportadas como carentes de lectina. Una de estas variedades es la Pinto 111 extensamente estudiada por Pusztai y col. (1981, 1982), quienes concluyeron que dicha variedad sí contiene lectinas, pero que son diferentes de las lectinas comunes de Phaseolus vulgaris. Se trata de una proteína dimérica; sin embargo, las raíces de plántulas de Pinto 111, especialmente cuando son inoculadas con Rhizobium sintetizan pequeñas cantidades de lectina común o similar a las demás de Phaseolus vulgaris, lo cual indica que los genes de lectina de frijol común en Pinto no están expresados pero si presentes.

Después, Horowitz (1985) comprobó que la variedad Pinto contiene genes para lectina de frijol común, pero la cantidad de RNA_m de lectina está sumamente reducida,

sugiriendo que a esto se debe el nivel tan bajo de lectina de frijol común en esta variedad de frijol.

Es importante determinar cuales son las características químicas y físicas de las lectinas del frijol en variedades de frijol para uso regional que han sido obtenidas usando un progenitor con baja actividad aglutinante, así como observar la variación que presentan, como producto de las cruas realizadas.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de la Muestra

Para la realización del estudio, se utilizaron las siguientes variedades de frijol tipo pinto: Agate, Amber, NW 410, Columbia y Pinto UI111; de las cuales tomaron muestras aleatorias de 1 Kg de cada una de las variedades a probar, se molieron y se pasaron por un tamiz de malla 100. La harina obtenida de cada variedad de frijol fué almacenada en frascos cerrados a 4°C para su posterior análisis.

Extracción de Proteína

La extracción de proteína se realizó agregando solución amortiguadora de borato de sodio 0.05 M, pH 8.5, a una muestra de harina (10:1 v/p), colocando 5 gr de harina de frijol crudo y 50 ml de solución amortiguadora en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, con agitación magnética lenta por dos horas a temperatura ambiente; posteriormente se centrifugó en una centrífuga refrigerada DAMON IEC B-20A a 14000 rpm por 1 hora a 4°C y se eliminó el precipitado, recuperando el sobrenadante.

Determinación de Proteína en Solución

El contenido de proteína en solución fué determinada por el método de Smith y col. (1985), utilizando el reactivo ácido bicinchoninico (PIERCE), para lo cual se realizó una curva estandar de proteína con albúmina de bovino.

Las fracciones cromatográficas fueron evaluadas en su contenido de proteína mediante la lectura de su absorbancia a 280 nm. en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 3A.

Fraccionamiento con Sulfato de Amonio

En la variedad Pinto UI111 se llevó a cabo un fraccionamiento mediante precipitación escalonada con sulfato de amonio. Se utilizaron los rangos de saturación de 0 a 40 %, de 40 a 60 %, de 60 a 80 % y de 80 a 100 %. A cada una de las fracciones obtenidas se les resuspendió en un volumen mínimo de la solución amortiguadora de extracción, se les midió su concentración de proteína en solución por el método ya descrito y su actividad hemaglutinante.

Cromatografía de Filtración en Gel

Las fracciones precipitadas con sulfato de amonio donde se encontró la actividad hemaglutinante fueron resuspendidas en un volumen mínimo de solución amortiguadora de extracción.

De cada variedad se inyectó una muestra de 1 ml de esta solución resuspendida a una columna cromatográfica de filtración en gel empacada con BioGel P-150 Grueso (Bio-Rad) con dimensiones (diámetro por altura) de 2.5 x 41 cm, con un volumen total de cama cromatográfica de 201.258 ml y un volumen vacío de 32.2 ml, el cual fué determinado inyectando a la columna 1 ml del colorante azul de dextrán (10 mg /ml), el cual posee un peso molecular de 2,000,000 D y midiendo el volumen de elución del mismo. Se utilizó la solución amortiguadora de extracción para eluir la muestra y se utilizó un flujo de 10 ml/hora, mediante una bomba peristáltica (Econo-Column BioRad) colectando fracciones de 3 ml (colector Buchler LC200). La elución de las proteínas fue monitoreada leyendo la absorbancia de las fracciones a 280 nm en un espectrofotómetro. Aquellas fracciones que mostraron hemaglutinación positiva, fueron combinadas y se les determinó la concentración de proteína en solución y la actividad específica.

Cromatografía de Afinidad

De cada variedad se tomaron 5 ml de extracto crudo y se inyectaron a una columna de afinidad empacada con fetuina-agarosa (SIGMA F3256) con dimensiones (diámetro x altura) de 1 x 9.5 cm, con un volumen total de cama cromatográfica de 7.46 cm³, manteniendo un flujo de 20 ml/hora y colectando fracciones de 3 ml.

Las proteínas no ligadas a la columna fueron eluidas mediante un lavado con solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.05 M pH, 7.4, conteniendo NaCl 0.15 mM hasta obtener una absorbancia a 280 nm de aproximadamente 0.05 (3 a 4 volúmenes de la cama cromatográfica).

La elución de las lectinas ligadas a la columna se realizó utilizando una solución amortiguadora de glicina - HCl 0.2 M, pH 2.6, y a las fracciones colectadas se les ajustó el pH a 6 con NaH₂PO₄ · 2H₂O 1M, para evitar su desnaturalización.

Las fracciones eluidas que mostraron la mayor absorbancia a 280 nm se almacenaron a 4°C para su posterior evaluación de actividad aglutinante y movilidad electroforética. A dichas fracciones eluidas de la cromatografía de afinidad se les determinó la concentración de proteína en solución.

Detección de Actividad Hemaglutinante

Las fracciones que presentaron presencia de proteína fueron evaluadas en su poder hemaglutinante por microtitulación seriada en pares según la técnica de Jaffé y Brucher (1974).

Esta técnica consiste en colocar 25 μ l de la solución amortiguadora de extracción en cada pozo de una placa de microtitulación de fondo cónico (Titertek), se añaden 25 μ l de la muestra con una micropipeta (Eppendorf) en el primer pozo y se realizan diluciones en serie, utilizando microdilutores (Titertek) de 25 μ l; posteriormente, en cada pozo de la placa se le agregan 25 μ l de una solución al 4 % de eritrocitos tripsinizados de vaca, se deja reposar por 1 hora y se observa visualmente la aglutinación. Aquellas muestras que forman un paquete de células sanguíneas en el fondo del pozo cónico son consideradas como aglutinación negativa y aquellas que no precipitan completamente se observan al microscopio a 40X. Si se observan aglutinados de células sanguíneas se considera como aglutinación positiva. Este procedimiento se realizó por duplicado. Se reporta como título de aglutinación al inverso de la última dilución con indicios de aglutinación.

Se determinó la actividad específica de cada fracción proteica con actividad aglutinante, denominándose así a la relación entre título de aglutinación por unidad de proteína de la muestra (Felsted y cols., 1981).

Electroforesis

De cada uno de los extractos de las variedades de frijol se tomó una alícuota de 1 ml del eluyente de la cromatografía de afinidad, así como del extracto crudo y de un estandar de proteínas de bajo peso molecular (Sigma SDS-7): (α -lactalbumina 14,200, inhibidor de tripsina de soya 20,100, tripsinógeno 24,000, anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino 29,000, deshidrogenasa gliceraldehido 3-fosfato 36,000, albúmina de huevo 45,000, albúmina de bovino 66,000). Se colocaron en tubos de ensayo a los cuales se les añadió 1 ml de una solución tris-Cl 0.125 M, pH 6.8, sulfato dodecil de sodio al 4%, glicerol al 20 % y 2-mercaptoetanol al 10%; se calentaron en un baño de agua a ebullición por 90 segundos, se enfriaron y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes bajo un sistema discontinuo (Laemmli, 1970). la electroforesis se llevó a cabo en una celda vertical en emparedado Protean II de 16/20 cm (BioRad). El sistema

consistió de un gel de empacado de 4 % de poliacrilamida y un gel de separación al 10% de poliacrilamida, con un grosor de 1.5 mm.

En el tanque de electroforesis se utilizó como solución amortiguadora tris 0.025 M, pH 8.3, glicina 0.192 M y sulfato dodecil de sodio al 0.1 %.

Al gel preparado se le inyectaron las siguientes cantidades: 15 μ l del extracto crudo, 100 μ l de las fracciones con actividad aglutinante y 50 μ l del estandar de pesos moleculares, además se inyectó el indicador azul de bromofenol al 0.002% para rastrear el frente de la corrida electroforética.

La electroforesis se llevó a cabo bajo voltaje variable y corriente de 15 amperes por 1 hora y 30 amperes por 4 horas. Las proteínas fueron teñidas en una solución de azul de Commassie R-250 al 0.125 %, metanol al 50 % y ácido acético al 10 % por toda la noche.

El gel fué desteñado en una solución de metanol al 50%, ácido acético al 10 % con agitación, en un aparato desteñidor modelo 556 (Bio-Rad). Las bandas obtenidas fueron comparadas con el estandar de proteínas para conocer su peso molecular.

RESULTADOS Y DISCUSION

Fraccionamiento con sulfato de amonio

Mediante la precipitación con sulfato de amonio se encontró que en la variedad Pinto UI111 el total de la actividad hemaglutinante se encontró en la fracción que precipita entre el 40 y el 80 % de saturación de sulfato de amonio; aunque, la mayor actividad se encontró en la fracción proteica que precipita entre el 40 y el 60 % de saturación, según lo mostrado en la Tabla 2.

Filtración en Gel

Al utilizar las fracciones proteicas precipitadas entre el 40 y el 80 % de saturación de sulfato de amonio de cada variedad para una separación mediante cromatografía de filtración en gel, con las condiciones ya mencionadas, se obtuvieron perfiles cromatográficos con pobre resolución, ya que las fracciones que tuvieron actividad hemaglutinante detectable se encontraron en el volumen de vacío en las variedades Ajate y Amber, y en un segundo pico traslapado con el volumen de vacío en la variedad Pinto UI111; por lo que se asume que estaban acompañadas por demasiados contaminantes.

Tabla 2. Actividad hemaglutinante y específica de fracciones proteicas de frijol Pinto UI111 precipitadas con sulfato de amonio.

% de Saturación	Concentración de proteína en solución ^a (mg/ml)	Título de Hemaglutinación ^b	Actividad Específica ^c
0 - 40	16.45	0	0
40 - 60	14.54	128	8.80
60 - 80	15.06	64	4.24
80 - 100	2.83	0	0

^a Método BCA (Smith y col., 1984).

^b Inverso de la última dilución con indicios de aglutinación.

^c Unidades de aglutinación por unidad de proteína.

Las fracciones que presentaron hemaglutinación positiva se encontraron sumamente diluidas por lo que se dificultaba su detección, tanto en el ensayo de aglutinación como en la electroforesis. Las condiciones cromatográficas no fueron las adecuadas y debían ser modificadas, en cuanto a dimensiones de la columna y flujo de la solución amortiguadora; sin embargo, la técnica propuesta probó ser demasiado laboriosa, tardada y las fracciones obtenidas eran sumamente diluidas, por lo que se optó por utilizar la técnica de cromatografía de afinidad directamente con extractos crudos de las muestras sin el paso preliminar de fraccionamiento con sulfato de amonio, seguida de filtración en gel.

Cromatografía de Afinidad

Se encontró que en las 5 variedades de frijol, una fracción proteica fué enlazada al ligando fetuína. En éstas fracciones, se encontró la totalidad de la actividad aglutinante de eritrocitos con diferentes títulos para cada variedad, no encontrándose actividad aglutinante de eritrocitos fuera del pico de elución con solución reguladora de glicina - HCl; sin embargo, dentro del pico de elución se encontraron fracciones que no tenían actividad hemaglutinante detectable.

El perfil cromatográfico de las variedades de frijol estudiadas fué muy similar, las diferencias en cuanto a su absorbancia a 280 nm se debieron a que en los extractos crudos se obtuvieron diferentes concentraciones de proteína en solución. El volumen al que eluyeron las proteínas que fueron atrapadas por el ligando dependió del volumen en que se realizó el cambio de solución amortiguadora de fosfato de sodio con cloruro de sodio a glicina-ácido clorhídrico. La recuperación de proteína con afinidad para el ligando también fué diferente en dichas variedades, siendo la variedad NW410 la mayor con 2.13 % de la proteína inyectada a la columna, siguiéndole la variedad Amber con 1.3 %, Pinto con 0.60 %, Columbia con 0.14 %, y Agate con 0.053 %, según se muestra en la Tabla 3.

Variedad Pinto UI111

Del frijol Pinto UI111 fueron inyectados a la columna cromatográfica un total de 55.35 mg de proteína (5 ml con una concentración de 11.07 mg/ml); se eluyeron 2 fracciones con actividad hemaglutinante de título 4, y una fracción con título 2, que representan un 0.60 % (0.063 mg) del total de proteína inyectada. Las 3 fracciones que presentaron actividad hemaglutinante tuvieron una lectura de absorbancia a 280 nm diferente, sin embargo en el ensayo de proteína en

Tabla 3. Recuperación de proteína en las fracciones con actividad hemaglutinante de las diferentes variedades de frijol purificadas mediante cromatografía de afinidad en fetuina-agarosa.

Variedad	Recuperación de Proteína (%) ^a
NW410	2.13
Amber	1.30
Pinto	0.60
Columbia	0.14
Agate	0.05

^a Del total de la muestra inyectada a la columna, determinada por el Método BCA (Smith y col., 1984).

solución arrojaron la misma concentración de proteína (0.007 mg/ml) . La fracción de título de hemaglutinación 2 posee una actividad específica de 285.71, y las fracciones de título 4 poseen una actividad específica de 571.4, según se muestra en la Tabla 4.

Variedad Amber

En cuanto a la variedad Amber fueron inyectados a la columna cromatográfica un total de 48 mg de proteína (5 ml con una concentración de 9.6 mg/ml); se eluyeron 3 fracciones con actividad aglutinante de títulos 4 y 16, que representan un 1.3% (0.623 mg) del total de proteína inyectada con una actividad específica de 132.23 en la fracción de mayor aglutinación, una actividad específica de 40 en la fracción 44 y 8 en la fracción 46, según se muestra en la Tabla 5.

Variedad Agate

De la variedad Agate fueron inyectados a la columna cromatográfica un total de 72 mg de proteína (5 ml con una concentración de 14.4 mg/ml); se eluyeron 2 fracciones con actividad aglutinante de título 32, que representan un 0.053 % (0.038 mg) del total de proteína inyectada, con una actividad específica de 388.34 en la fracción 33 y 99.1 en la fracción 32, según se muestra en la Tabla 6.

Tabla 4. Purificación de lectinas de frijol variedad Pinto UI111.

Muestra	Concentración de proteína en solución ^a (mg/ml)	Título de Hemaglutinación ^b	Actividad Específica ^c
Extracto crudo	11.070	4	0.3
Fracción 31	0.007	2	285.7
Fraccion 32	0.007	4	571.4
Fraccion 33	0.007	4	571.4

^a Método BCA (Smith y col., 1984).

^b Inverso de la última dilución con indicios de aglutinación.

^c Unidades de aglutinación por unidad de proteína.



BIBLIOTECA
C C I Alimentos

Tabla 5. Purificación de lectinas de frijol variedad Amber.

Muestra	Concentración de proteína en solución ^a (mg/ml)	Título de Hemaglutinación ^b	Actividad Específica ^c
Extracto crudo	9.600	16	1.6
Fraccion 44	0.100	4	40.0
Fraccion 45	0.121	16	132.2
Fracción 46	0.499	4	8.0

^a Método BCA (Smith y col., 1984).

^b Inverso de la última dilución con indicios de aglutinación.

^c Unidades de aglutinación por unidad de proteína.

Tabla 6. Purificación de lectinas de frijol variedad Agate.

Muestra	Concentración de proteína en solución ^a (mg/ml)	Título de Hemaglutinación ^b	Actividad Específica ^c
Extracto crudo	14.440	8	0.6
Fraccion 32	0.323	32	99.1
Fraccion 33	0.082	32	388.3

^a Método BCA (Smith y col., 1984).

^b Inverso de la última dilución con indicios de aglutinación.

^c Unidades de aglutinación por unidad de proteína.

Variedad Columbia

En cuanto a la variedad Columbia, fueron inyectados a la columna cromatográfica un total de 70.85 mg de proteína (5 ml con una concentración de 14.17 mg/ml); eluyéndose 2 fracciones con actividad aglutinante de título 8, que representan un 0.1473 % (0.104 mg) del total de proteína inyectada, con una actividad específica de 133.33 en la fracción 70 y 37.4 en la fracción 71, según se muestra en la Tabla 7.

Variedad NW410

En cuanto a la variedad NW410, fueron inyectados a la columna cromatográfica un total de 54.05 mg de proteína (5 ml con una concentración de 10.81 mg/ml); eluyéndose 2 fracciones con actividad aglutinante de título 16, que representan un 2.1313 % (1.152 mg) del total de proteína inyectada, con una actividad específica de 551 en la fracción 32 y 126.7 en la fracción 31, según se muestra en la Tabla 8.

Al comparar en cada variedad la actividad específica del extracto crudo con aquella de la fracción con mayor actividad se obtienen los siguientes valores de purificación: PintoUI111 1904 veces, Amber 82 veces, Agate 647 veces, Columbia 60 veces y NW410 1380 veces.

Tabla 7. Purificación de lectinas de frijol variedad Columbia.

Muestra	Concentración de proteína en solución ^a (mg/ml)	Título de Hemaglutinación ^b	Actividad Específica ^c
Extracto crudo	14.170	32	2.2
Fraccion 70	0.060	8	133.3
Fraccion 71	0.214	8	37.4

^a Método BCA (Smith y col., 1984).

^b Inverso de la última dilución con indicios de aglutinación.

^c Unidades de aglutinación por unidad de proteína.

Tabla 8. Purificación de lectinas de frijol variedad NW410.

Muestra	Concentración de proteína en solución ^a (mg/ml)	Título de Hemaglutinación ^b	Actividad Específica ^c
Extracto crudo	10.810	4	0.4
Fraccion 31	0.126	16	126.7
Fraccion 32	0.029	16	551.7

^a Método BCA (Smith y col., 1984).

^b Inverso de la última dilución con indicios de aglutinación.

^c Unidades de aglutinación por unidad de proteína.

Los valores tanto de título de hemaglutinación, como de actividad específica obtenidos, son difíciles de comparar con otros estudios ya que en la literatura científica no se encuentra homogeneidad en la manera de reportar la actividad biológica de las lectinas, sin embargo, en referencia únicamente a la última dilución a la que presentaron actividad detectable, las variedades en estudio se pueden considerar de baja actividad, al comparar con los resultados de Koehler y cols., 1986 y de Jaffé y Brücher, 1972.

Los cromatogramas de las diferentes variedades de frijol son mostradas en las Figuras 2 a 6.

Se pudo observar una diferencia en la actividad específica de los extractos crudos de las variedades de frijol en estudio siendo Pinto UI111 (el progenitor común) la de menor actividad y Columbia la de mayor actividad, según se aprecia en la Figura 7.

De las lectinas aisladas, las fracciones más activas de cada variedad también mostraron variación al ser aisladas por esta metodología, se encontró que la lectina aislada con mayor actividad específica fué la de la variedad Pinto UI111, siguiéndole NV410, Agate, Columbia y Amber.

Las diferencias en cuanto a la actividad específica podría deberse a la estructura de las lectinas de las diversas variedades.

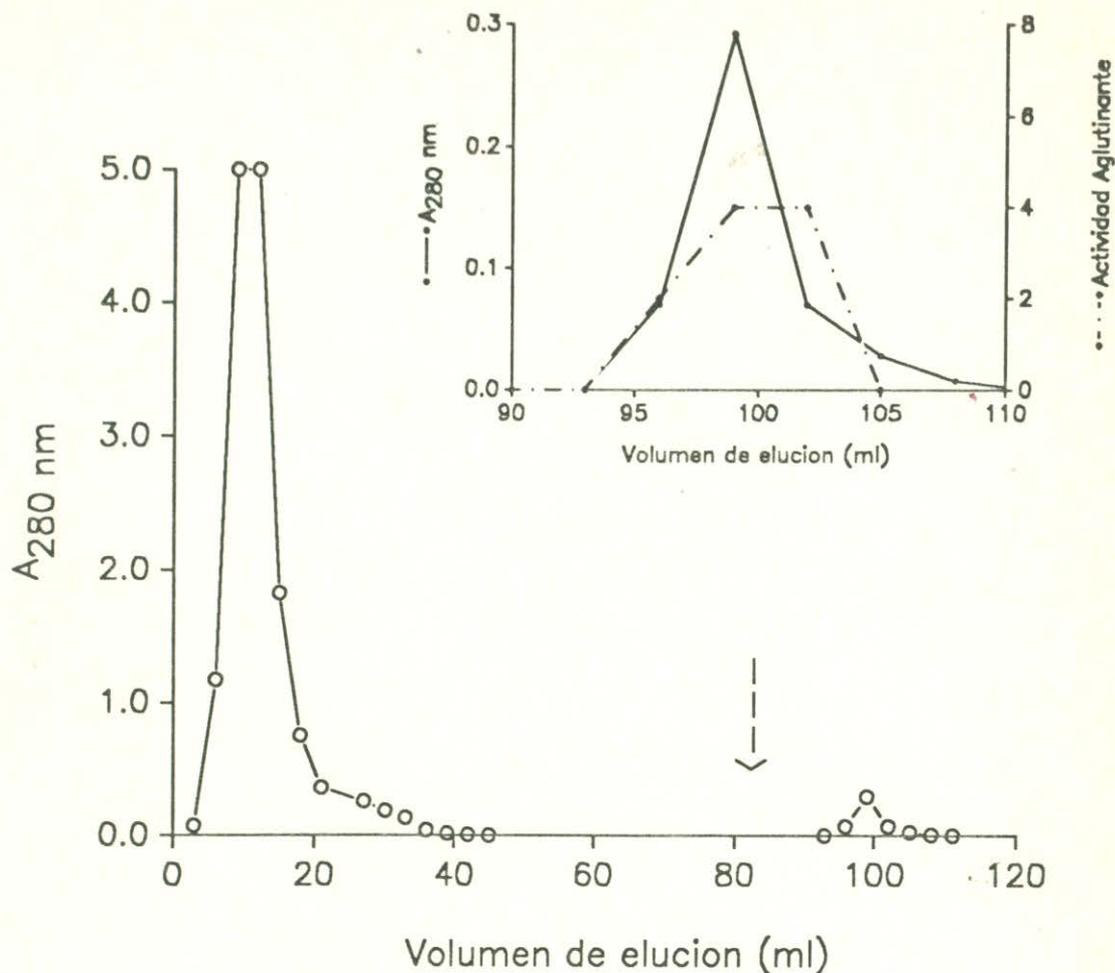


Figura 2. Cromatograma de extracto crudo de frijol Pinto UI111 en fetuina-agarosa (1 x 9.5 cm), elución de proteínas no ligadas con solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.05 M pH 7.4, conteniendo NaCl 0.15 mM y elución de proteínas ligadas con solución amortiguadora glicina-HCl 0.2 M pH 2.6. Flujo de 20 ml/Hora y fracciones de 3 ml. Flecha: cambio de solución amortiguadora. Recuadro: actividad hemaglutinante.

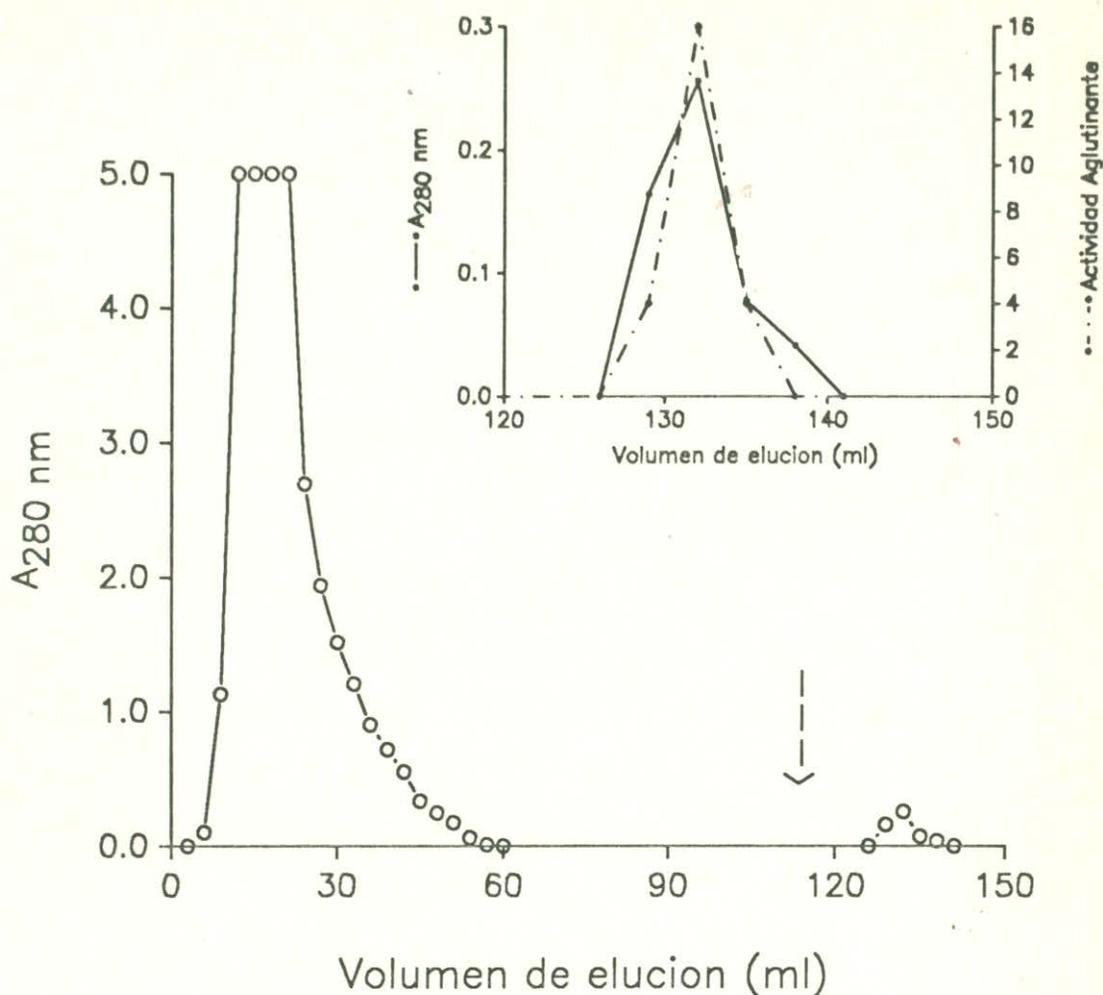


Figura 3. Cromatograma de extracto crudo de frijol Amber en fetuina-agarosa (1 x 9.5 cm), elución de proteínas no ligadas con solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.05 M pH 7.4, conteniendo NaCl 0.15 mM y elución de proteínas ligadas con solución amortiguadora glicina-HCl 0.2 M pH 2.6. Flujo de 20 ml/Hora y fracciones de 3 ml. Flecha: cambio de solución amortiguadora. Recuadro: actividad hemaglutinante.

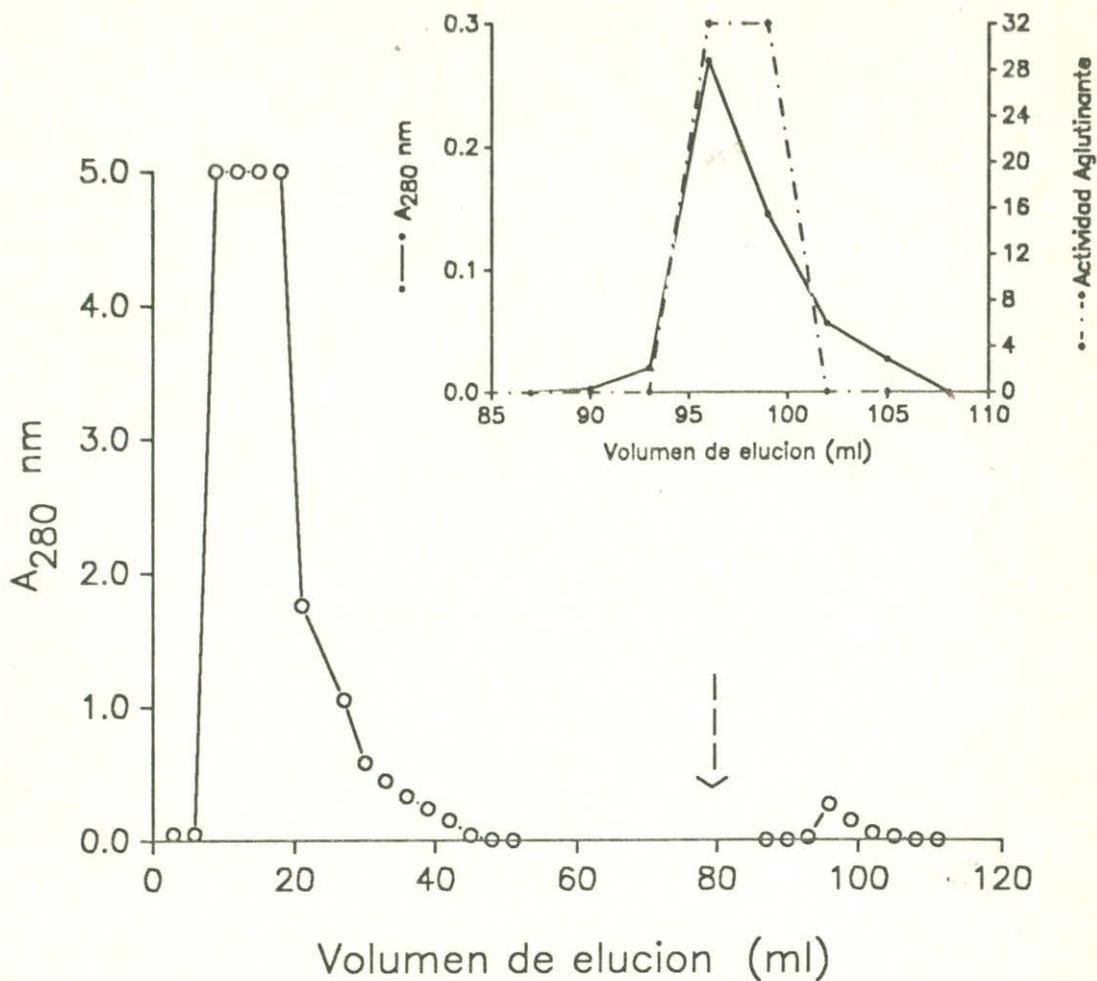


Figura 4. Cromatograma de extracto crudo de frijol Agate en fetuina-agarosa (1 x 9.5 cm), elución de proteínas no ligadas con solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.05 M pH 7.4, conteniendo NaCl 0.15 mM y elución de proteínas ligadas con solución amortiguadora glicina-HCl 0.2 M pH 2.6. Flujo de 20 ml/Hora y fracciones de 3 ml. Flecha: cambio de solución amortiguadora. Recuadro: actividad hemaglutinante.

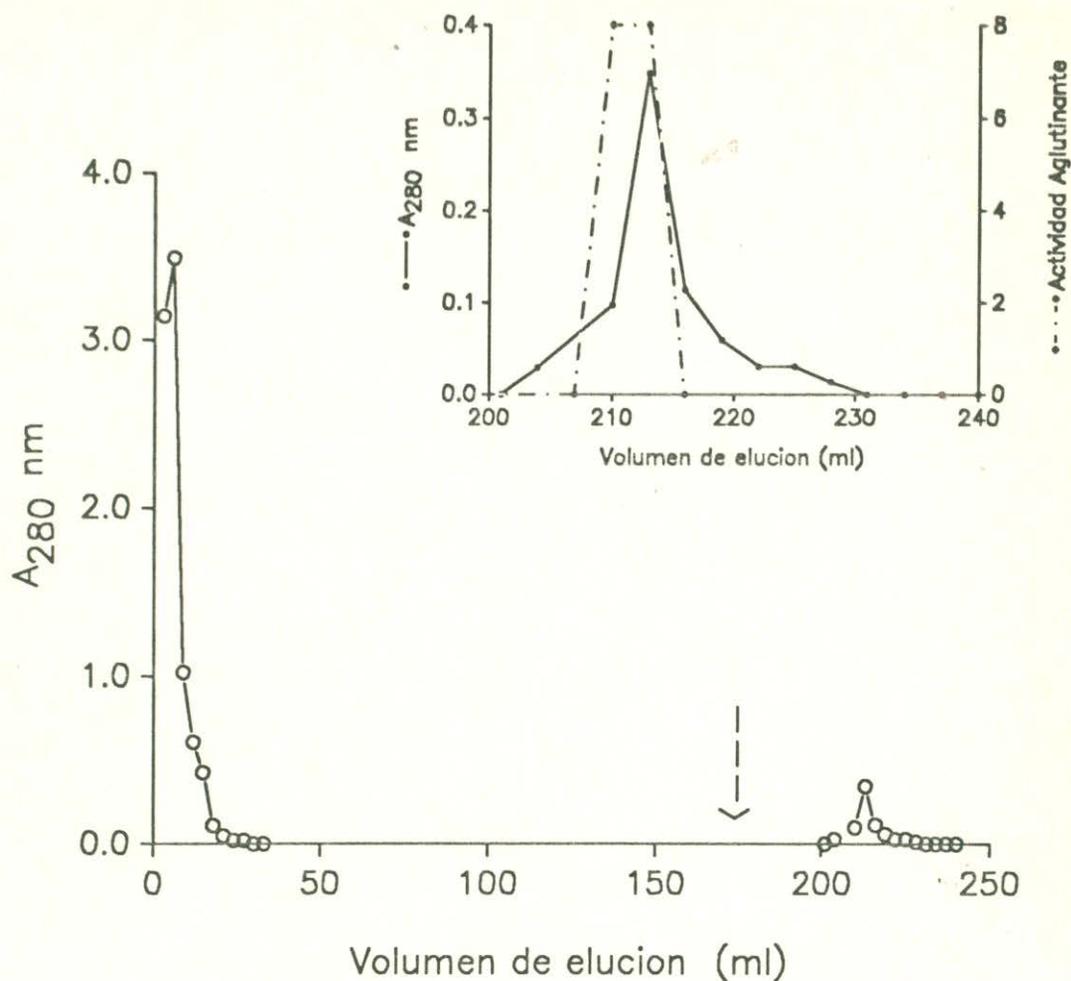


Figura 5. Cromatograma de extracto crudo de frijol Columbia en fetuina-agarosa (1 x 9.5 cm), elución de proteínas no ligadas con solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.05 M pH 7.4, conteniendo NaCl 0.15 mM y elución de proteínas ligadas con solución amortiguadora glicina-HCl 0.2 M pH 2.6. Flujo de 20 ml/Hora y fracciones de 3 ml. Flecha: cambio de solución amortiguadora. Recuadro: actividad hemaglutinante.

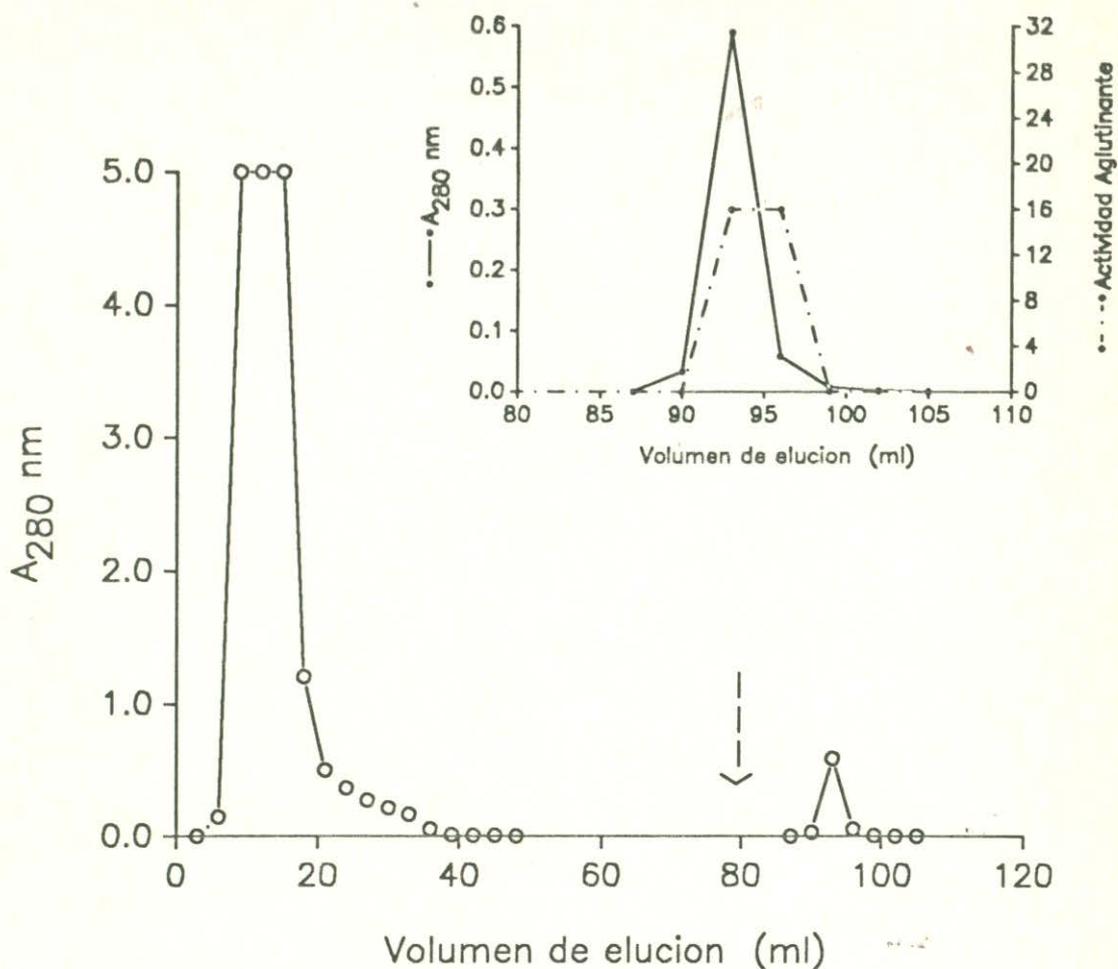


Figura 6. Cromatograma de extracto crudo de frijol NW410 en fetuina-agarosa (1 x 9.5 cm), elución de proteínas no ligadas con solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.05 M pH 7.4, conteniendo NaCl 0.15 mM y elución de proteínas ligadas con solución amortiguadora glicina-HCl 0.2 M pH 2.6. Flujo de 20 ml/Hora y fracciones de 3 ml. Flecha: cambio de solución amortiguadora. Recuadro: actividad hemaglutinante.

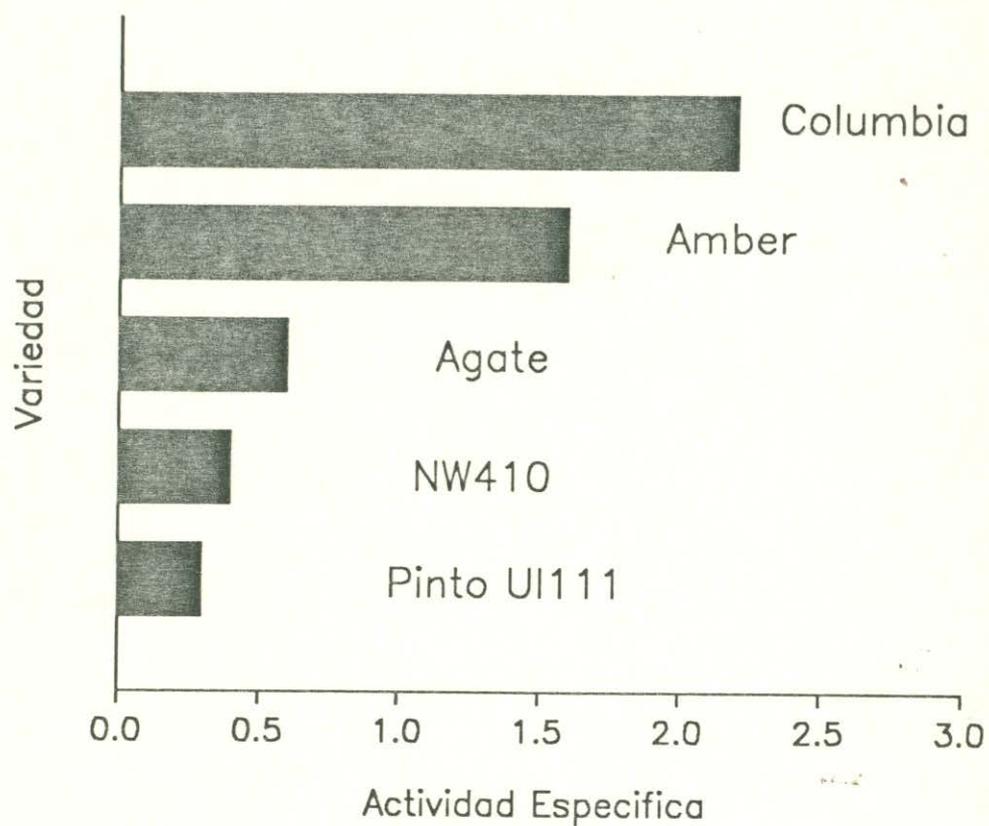


Figura 7. Actividad específica de extractos crudos de diferentes variedades de frijol.

Se muestra la actividad de las lectinas de las variedades en la Figura 8. Las variedades cuyo extracto crudo arrojó un menor valor de actividad específica tuvieron los mayores valores de esta misma actividad al ser aisladas las lectinas, lo cual puede indicar que la actividad hemaglutinante no sólo depende de la presencia de lectinas, sino también de otros compuestos que son eliminados durante la separación cromatográfica, y que pueden inhibir hasta cierto punto la manifestación de esa actividad biológica.

Se observó que no todas las proteínas enlazadas por la fetuína mostraron aglutinación detectable de eritrocitos, por lo cual es posible que estas proteínas enlazadas por la fetuína sean una forma de lectina no eritroaglutinante, dichas formas de lectina no fueron monitoreadas en el presente estudio, se considera necesario someter la totalidad de estas fracciones atadas a la fetuína a un fraccionamiento mediante otra técnica cromatográfica tal como la de Intercambio Iónico, así como utilizar técnicas que permitan identificar a las formas de lectina no eritroaglutinante.

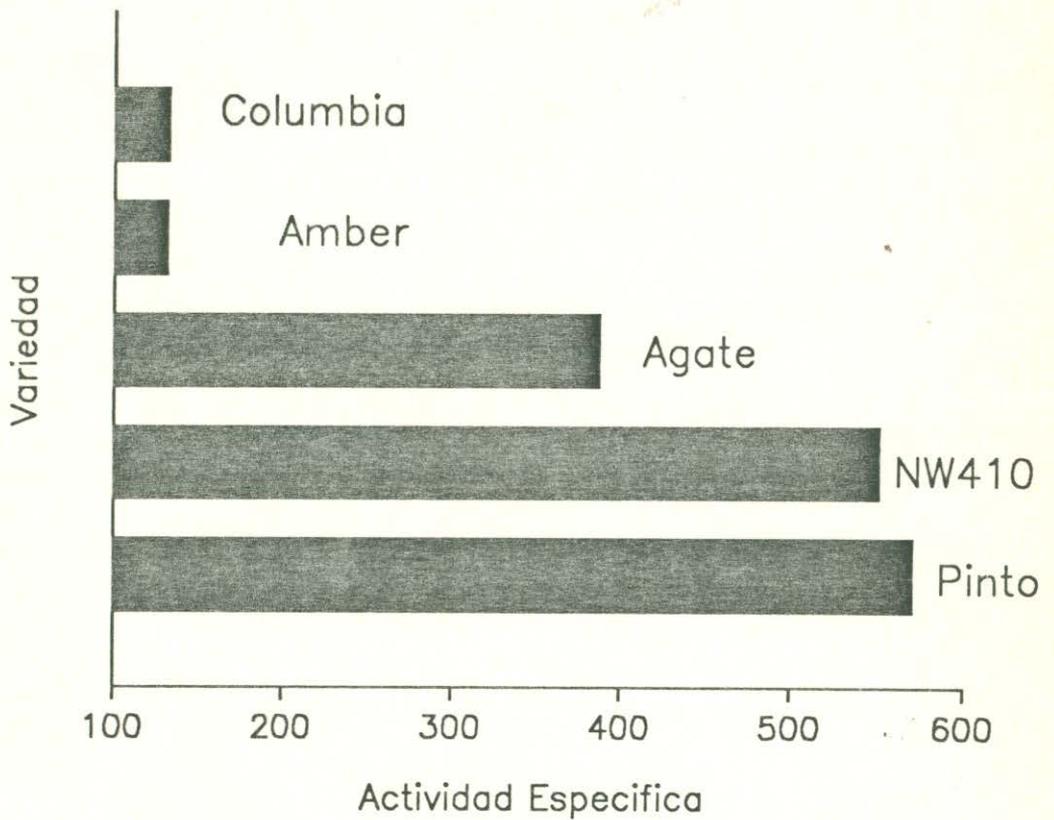


Figura 8. Actividad específica de fracciones separadas mediante cromatografía de afinidad en fetuina-agarosa de diferentes variedades de frijol.

Electroforesis

Los patrones electroforéticos obtenidos de los extractos crudos de las cinco variedades de frijol fueron muy similares entre sí cuanto a las bandas mas importantes y mostraron también similitud con los patrones electroforéticos del frijol Pinto 111 reportadas por Pusztai y col. (1983). En todas las variedades evaluadas se presentó una zona en la que se pueden distinguir varias bandas gruesas muy coloreadas con un Rf entre 0.3 a 0.36 de movilidad, y que corresponden a subunidades de la proteína mas importante cuantitativamente en la semilla de frijol, con un coeficiente de sedimentación 7s y peso molecular de 43,000 a 53,000 D, según lo reportado por Pusztai y Stewart (1980), quienes la llamaron "glucoproteína II". Además de esta zona fuertemente coloreada, otras bandas de diferentes intensidades se encontraron en todas las variedades.

El patrón electroforético de las fracciones que tuvieron actividad eritroaglutinante presentó dificultades en su detección debido a las cantidades tan pequeñas de proteína encontradas en las fracciones enlazadas a la columna de afinidad, por lo que se recurrió a dializarlas para fines de concentración, resuspendiendo en 1 ml de la solución amortiguadora de muestra e inyectando 50 μ l de la muestra en

el gel. Sólo se presentó una banda en el caso de la variedad Amber, en correspondencia con una de las bandas fuertes del extracto crudo, según se aprecia en la Figura 9. En el resto de las variedades, las fracciones enlazadas a la fetuína, se encontraron sumamente diluidas, por lo que no se les pudo detectar visualmente. No se contó con el equipo indispensable para tener una apreciación de cantidades tan pequeñas de proteína que permitieran establecer una comparación de la pureza de las fracciones obtenidas mediante la técnica de afinidad.



BIBLIOTECA
D. I. P. A.

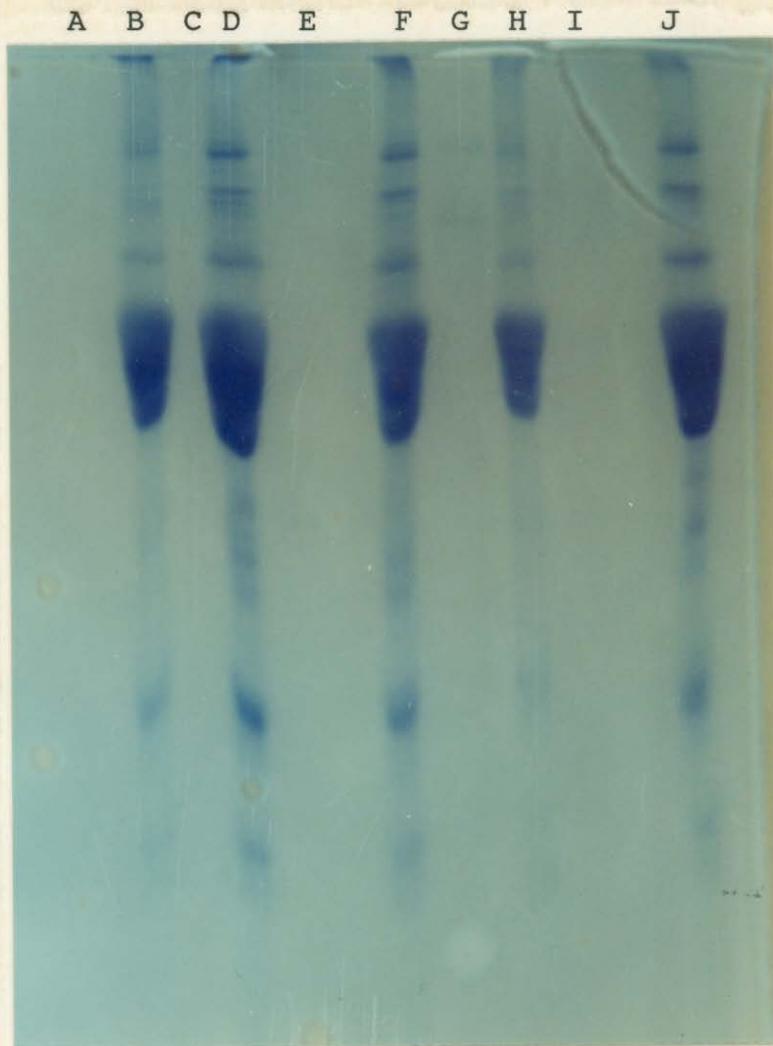


Figura 9. Patrón electroforético de extractos crudos de las variedades de frijol utilizadas (B: Pinto UI111, D: NW410, F: Columbia, H: Amber y J: Agate) y las lectinas purificadas (A: Pinto UI111, C: NW410, E: Columbia, G: Amber y I: Agate), mediante cromatografía de afinidad en fetuína-agarosa.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos en esta investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1) La totalidad de la actividad eritroaglutinante en las variedades de frijol probadas se encuentra en la fracción proteica que precipita en un rango de 40 - 80 % de saturación de sulfato de amonio, por lo cual, en ciertos casos, el fraccionamiento en este rango de saturación, pudiera utilizarse como un paso preliminar en la separación de las lectinas de frijol.

2) Los extractos crudos de las variedades de frijol Pinto UI111, Amber, Agate, Columbia y NW410 presentan diferencias en actividad eritroaglutinante, lo cual puede considerarse como un indicador de que poseen distintas lectinas en cantidad y/o en calidad.

3) Se encontró homogeneidad en el patrón electroforético de las variedades en estudio, aunque no fué posible detectar las bandas correspondientes a la actividad eritroaglutinante en todas las variedades de frijol en estudio.

4) La metodología cromatografía de afinidad utilizando fetuína-agarosa permitió una separación rápida y en un solo paso de las proteínas de frijol que causan aglutinación de eritrocitos, sin embargo, la recuperación fué diferente en las distintas variedades.

5) Las lectinas separadas mediante cromatografía de afinidad en fetuína-agarosa fueron diferentes en cuanto a su actividad eritroaglutinante específica.

6) Las lectinas aparentemente son diferentes en cuanto a su actividad aglutinante cuando están formando parte del complejo de sustancias en la semilla y cuando se encuentran en forma aislada, sin la presencia de interferentes o activadores.

7) Las cruces de frijol pinto que se han realizado en los centros de fitomejoramiento ha tenido un impacto tanto cuantitativo como cualitativo en lo que respecta al factor lectinas del frijol Pinto.

Se tienen las siguientes recomendaciones para investigaciones futuras:

- 1) Se recomienda continuar con la caracterización de las lectinas de las variedades utilizadas en esta investigación, en cuanto a su peso molecular, carbohidratos específicos, punto isoelectrico y estructura primaria de las proteínas.
- 2) Implementar una técnica electroforética más sensible en la detección de cantidades muy pequeñas de proteína, que permita utilizar directamente fracciones de separaciones cromatográficas.
- 3) El estudio de las formas de lectina que poseen características leucoaglutinantes y mitógenas de linfocitos, de tal manera que ~~el~~ se profundice el panorama global de las lectinas que están presentes en el frijol.
- 4) La utilización de las lectinas aisladas en estudios nutricionales con animales experimentales, que nos permitan comprender mejor sus efectos en la dieta y los mecanismos de su inactivación.

BIBLIOGRAFIA

- Barrón, J. M. 1984. Textural, Nutritional and Toxicological Qualities of Pinto Bean (Phaseolus vulgaris L.) UI111. Ph D. Thesis. University of London. London, U. K. p 84.
- Barondes, S. H. 1981. Lectins : Their Multiple Endogenous Cellular Functions. Ann. Rev. Biochem. 50: 207.
- Bender, A. E. y Reaidi, G. B. 1982. Toxicity of Kidney Beans (Phaseolus vulgaris) with Particular Reference to Lectins. J. Plant Foods 4: 15.
- Bohloul, B. B. y Schmidt, E. L. 1974. Lectins: A Possible Basis for Specificity in the Rhizobium-Legume Root Nodule Symbiosis. Science 185: 269.
- Boyd, W. C. y Sharpliegh, E. 1954. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). Science 119: 419.
- Bressani, R. y Elias, L. G. 1974. Legume Foods. In: "New Protein Foods" Vol. 1 A. M. Alschul (ed.). Academy Press, Inc., New York. pp. 230.
- Carpenter, K. J. 1981. The Nutritional Contribution of Dry Beans (Phaseolus vulgaris) in Perspective. Food Technology. 35 (3) : 77.

- Grant, G., More, L. J., McKenzie, H. y Pusztai, A. 1982. The Effect of Heating on the Haemagglutinating Activity and Nutritional Properties of Bean (Phaseolus vulgaris) Seeds. J. Sci. Food Agric. 33: 1324.
- Goldstein, I. J. y Poretz, R. D. 1986. Isolation and Chemical Properties of Lectins. In: The Lectins : Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine. I. Liener, H. Lis, and I. J. Goldstein (eds.). Academic Press, Inc. New York. pp. 249.
- Harris. 1915. Ph.D. Dissertation, Yale Univ., New Haven Conn., U. S. A. citado por: Toms, G. C. y Western, A. 1971. Phytohaemagglutinins. In: Chemotaxonomy of the Leguminosae. J. B. Harborne, D. Boulter and B. L. Turner (eds.). pp. 367.
- Horowitz, J. 1985. A Phaseolus mutation in a reduced level of lectin mRNA. Mol. Genet. 198: 482.
- Jaffé, W. G. 1980. Hemagglutinins (Lectins). In: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. 2nd. Ed. I. Liener (ed.). Academic Press. New York. pp. 73.
- Jaffé, W. G. y Brucher, O. 1972. Toxicidad y Especificidad de Diferentes Hemagglutininas de Frijoles (Phaseolus vulgaris). Arch. Latinoamer. de Nutr. 22: 267.

- Janzen, D. H., Juster, H. B. and Liener, I. L. (1972).
Insecticidal Action of the Phytohemagglutinin in Black
Beans on a Bruchid Beetle. *Science* 192: 795.
- Klozova, E. y Turkova, V. 1978. Variability of Some Seed
Proteins of The Species Phaseolus vulgaris and their
Relationship to Phytohemagglutinating Activity.
Biol. Plant. 20: 129.
- Koehler, H. H., Herrick, H. E. y Burke, D. W. 1986.
Differentiating the Lectin Activity in Twenty-Four
Cultivars of Dry Beans (Phaseolus vulgaris L.). *J. Food
Sci.* 51: 1471.
- Kokourek, J. y Horejsi, V. 1983. A Note on the Recent
Discussion on Definition of the Term "Lectin". In:
Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry.
T. C. Bog-Hansen y G. A. Spengler, (eds.). De Gruyter,
Berlin/New York, pp. 3.
- Landsteiner, K. y Raubitschek, H. 1908. Beobachtungenuver
Hamolyse and Haemagglutination. *Zbl. Bakt. Parasitenk
Abt II*, 45: 660. citado por: Liener, I. 1981. The
Nutritional Significance of the Plant Lectins. In:
Antinutrients and Natural Toxicants in Foods. R. L. Ory
(ed.). Food & Nutrition Press. Westport, Conn. (U. S.
A.) pp. 143.

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680.
- Liener, I. y Pallansch, M. J. 1952. Purification of a Toxic Substance from Deffated Soybean Fluor. *J. Biol. Chem.* 197: 29.
- Liener, I. 1974. Phytohemagglutinins: Their Nutritional Significance. *J. Agr. Food Chem.* 22: 17.
- Liener, I. 1976. Phytohemagglutinins (Phytolectins). *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27: 291.
- Liener, I. 1979. Significance for Humans of Biologically Active Factors in Soybeans and Other Legumes. *J. Am. Oil Chem.* 56: 121.
- Liener, I. 1981. The Nutritional Significance of the Plant Lectins. In: *Antinutrients and Natural Toxicants in Foods*. R. L. Ory (ed.). Food & Nutrition Press. Westport, Conn. (U. S. A.) pp. 143.
- Liener, I. 1986. Nutritional Significance of Lectins in the Diet. In: *The Lectins : Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. I. Liener, H. Lis, and I. J. Goldstein (eds.). Academic Press, Inc. New York. pp. 527.

- Lis, H. y Sharon, N. 1981. Lectins in Higher Plants. In: The Biochemistry of Plants Vol. 6. E. Conn, y P. Stumpf, (eds.) Academic Press. New York. pp. 371.
- Lis, H. y Sharon, N. 1986. Biological Properties of Lectins. In: The Lectins : Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. I. Liener, H. Lis, and I. J. Goldstein, (eds.). Academic Press. New York. pp 265.
- Miller, J. B., Noyes, C., Heinrikson, R., Kingdom, H. S. y Yachnin, S. 1973. Phytohemagglutinin Mitogenic Proteins. Structural Evidence for a Family of Isomitogenic Proteins, J. Exp. Med. 138: 939.
- Murray, D. R. 1984. Acumulation of Seed Reserves of Nitrogen. In: Seed Physiology. Vol. 1. D. R. Murray, (ed.). Academic Press. North Ryde, Australia. pp 95.
- Novakova, N. y Kokourek, J. 1974. Studies on Phytohemagglutinins. XX. Isolation and Characterization of Hemagglutinins from Scarlet Runner Seeds (Phaseolus coccineus L.). Biochim. Biophys. Acta 359: 320.
- Osborn, T. C. y Bliss, F. A. 1985. Effects of Removing Lectin Seed Protein on Horticultural and Seed Characteristics of Common Bean. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110: 484.

- Ohtani, K. y Misaki, A. 1979. Chemical and Biological Characterization of Tora Bean (Phaseolus vulgaris) Lectin. Abstracts of Papers ACS, CARB 48 ACS/CSJ Chemical Congress, Honolulu, Hawaii, April 16, 1979.
- Pusztai, A. y Watt, W. B. 1974. Isolectins of Phaseolus vulgaris. A Comprehensive Study of Fractionation. Biochem. et Biophys. Acta 565: 57.
- Pusztai, A. y Stewart, J. C. 1980. Molecular Size, Structure and Microheterogeneity of Glicoprotein II from the Seeds of Kidney Bean (Phaseolus vulgaris L.) Biochem. et Biophy. Acta 623: 418.
- Pusztai, A., Grant, G. y Stewart, J. C. 1981. A New Type of Phaseolus vulgaris (Cv. Pinto III) Seed Lectin: Isolation and Characterization. Biochem. et Biophys. Acta 671: 146.
- Pusztai, A., Grant, G. y Stewart, J. C. 1982. The Isolation and Characterization of an Unusual Seed Lectin from a "Lectin free" cultivar of Phaseolus vulgaris, Pinto III and its Relationship to Lectins Synthesised by Root Cells. In: Lectins, Biology and Biochemistry Vol II. T. C. Bog-Hansen y D. L. J. Freed (eds.). Walter de Gruyter & Co. Berlin. pp. 743.

- Pusztai, A., Croy, R. R. D., Grant, G. y Stewart, J. C. 1983. Seed Lectins : Distribution, Location and Biological Role. In: Seed Proteins. J. Daussant, J. Mossé and J. Vaughan (ed.). Academic Press. London. pp. 53.
- Pusztai, A. 1989. Lectins. In: Toxicants of Plant Origin Vol III. P. R. Cheeke (ed.). CRC Press. Boca Raton, Fla. pp. 29.
- Renkonen, K. O. 1948. Studies on Hemagglutinins Present in Seeds of Some Representatives of the Family Leguminosae. Ann. Med. Exptl. Fenn. 26: 66.
- Rigas, D. A. y Johnson, E. A. 1964. Studies on the Phytohemagglutinin of Phaseolus vulgaris and its Mitogenicity. Ann. N. Y. Acad. Sci. 113: 800.
- Rigas, D. A. y Odgood, E. A. 1955. Purification and Properties of the Phytohemagglutinin of Phaseolus vulgaris. J. Biol. Chem. 212: 607.
- Rouanet, J. M., Besancon, P. y Lafont, J. 1983. Effects of Lectins from Leguminous Seeds on Rat Duodenal Enterokinase Activity. Experientia 39. Birhäuser Verlag. Basel/ Switzerland. pp. 1356.

- Rouanet, J. M., Mahamat-Silaye, O., Besancon, P. 1982. Effets d' une Lectine Purifiée de Haricot (Phaseolus vulgaris) sur L'Invertase, L'Amino-peptidase et la Phosphatase Alcalina de L'Intestin du Rat. Sci. Aliments 2 No. hours série II pp. 183.
- Salunkhe, D. K., Kadham, S. S. and Chavan, J. K. 1985. Postharvest Biotechnology of Food Legumes. CRC Press. pp. 38.
- Sgarbieri, V. C. y Whitaker, J. R. 1982. Physical, Chemical and Nutritional Properties of Common Bean (Phaseolus) Proteins. Advances in Food Research. Vol. 28 pp. 93.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. Anal. Biochem. 150: 76.
- Schnebli, H. P. 1988. Survey of Agglutinating Techniques: How they Affect the Result. In: Lectins: Biology-Biochemistry, Clinical Biochemistry Vol. 6. T. C. Bog-Hansen and D. L. J. Freed (ed.). Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. pp. 249.

- Sillmark, H. 1888. Der Giftige Eisweisskroper ricin. Seine Wirkung auf das blut (Inaug. Diss. Dorpat). citado por: Liener, I. 1981. The Nutritional Significance of the Plant Lectins. In: Antinutrients and Natural Toxicants in Foods. R. L. Ory (ed.). Food & Nutrition Press. Westport, Conn. (U. S. A.) pp. 143.
- Strosberg, A. D., Buffard, D., Lauwereys, M. y Foriers, A. 1986. A Large Family of Homologous Proteins. In: The Lectins : Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. I. Liener, H. Lis and I. J. Goldstein (eds.). Academic Press, Inc. New York. pp. 249.
- Takahashi, T., Ramachandramurthy, P. y Liener, I. E. 1967. Some Physical and Chemical Properties of Phytohemagglutinin Isolated from Phaseolus vulgaris. Biochem. Biophys. Acta 133: 123.
- Thompson, L. U., Rea, R. L. y Jenkins, D. J. A. 1983. Effect of Heat Processing on Hemagglutinin Activity in Red Kidney Beans. J. Food Sci. 48: 235.
- Thorn, K. A., Tinsley, A. M., Weber, C. W. y Berry, J. W. 1983. Antinutritional Factors in Legumes of the Sonoran Desert. Ecol. Food Nutr. 13: 251.

- Toms, G. C. 1981. Lectins in Leguminosae. In : Advances in Legume Systematics. R. M. Polhill y P. H. Raven (eds.). pp 561.
- Toms, G. C. y Western, A. 1971. Phytohaemmagglutinins. In: Chemotaxonomy of the Leguminosae. J. B. Harborne, D. Boulter and B. L. Turner (eds.). pp. 367.
- Van Driessche, E. 1988. Structure and Function of Leguminosae Lectins. In: Advances in Lectin Research. Vol. 1, H. Franz (ed.). Springer - Verlag. Berlin, W. Germany. pp. 187.
- Vidhyasekaran, P. 1988. Physiology of Disease Resistance in Plants. CRC Press. Boca Raton, Fla. pp. 17.



BIBLIOTECA
CCI Alimentos