

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**AISLAMIENTO Y TERMOESTABILIDAD DE  
LOS INHIBIDORES DE TRIPSINA DEL  
FRIJOL NEGRO (*P. vulgaris*)**

Informe de Tesis

Presentado por

**JULIETA EUGENIA ORTIZ CHACON**

al conferírsele el Grado Académico de

LICENCIADA EN QUIMICA

GUATEMALA, ABRIL DE 1996

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

DK  
06  
T(1773

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS  
DE GUATEMALA



FACULTAD DE CC. QQ. Y FARMACIA

Edificio "T-12"

Ciudad Universitaria, Zona 12  
Guatemala, Centroamérica

JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

|            |                                     |
|------------|-------------------------------------|
| DECANO     | LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR     |
| SECRETARIA | LICDA. ELEONORA GAITAN IZAGUIRRE    |
| VOCAL I    | LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ    |
| VOCAL II   | LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN  |
| VOCAL III  | LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME |
| VOCAL IV   | BR. ANA MARIA RODAS CARDONA         |
| VOCAL V    | BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA     |

## DEDICATORIA

Dedico esta Tesis a:

Dios, mi Padre Eterno, mi Salvador, mi Consejero y mi Señor,  
a El sea toda Gloria.

Mi padre, Oscar Ortiz Mayén, por su amor, por su bondad y sencillez, por sus sabios consejos.

Mi madre, Eugenia Chacón de Ortiz, por su incomparable amor y por su gran dedicación para cuidarme y formarme.

Mi esposo, Arnolando García Soto, mi cobertura, por su paciente amor y por su gran ayuda.

Mis hijos, Esteban José, Pablo David y al pequeño que está en mi vientre, mis tesoros.

Mi hermano, Oscar Mauricio Ortiz. con mucho cariño.

Mi abuelita, Tita Walsh, por su amor y apoyo.

## AGRADECIMIENTOS

Por su valiosa orientación a:

Dr. Omar Dary,  
Dr. Enrique Acevedo y  
Dr. Ricardo Bressani

Por su apoyo y cooperación a:

Lic. Mynor Ordoñez,  
Lic. Luis Velásquez,  
Ing. Nehemías Arana,  
Ing. Víctor Azañón,  
Sr. Hugo Paz y  
Sr. Ulises Rodas.

Por haber hecho posible que se llevara a cabo esta investigación,  
a:

El Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá.

Por haberme dado las bases para poder realizar esta investigación  
a:

La Universidad de San Carlos de Guatemala y en especial a la  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

|     |                                   |    |
|-----|-----------------------------------|----|
| 1.  | RESUMEN . . . . .                 | 1  |
| 2.  | INTRODUCCION . . . . .            | 3  |
| 3.  | ANTECEDENTES . . . . .            | 5  |
| 4.  | JUSTIFICACIONES . . . . .         | 16 |
| 5.  | OBJETIVOS . . . . .               | 17 |
| 6.  | HIPOTESIS . . . . .               | 18 |
| 7.  | MATERIALES Y METODOS . . . . .    | 19 |
| 8.  | RESULTADOS . . . . .              | 26 |
| 9.  | DISCUSION DE RESULTADOS . . . . . | 29 |
| 10. | CONCLUSIONES . . . . .            | 36 |
| 11. | RECOMENDACIONES . . . . .         | 37 |
| 12. | REFERENCIAS . . . . .             | 38 |
| 13. | ANEXOS . . . . .                  | 46 |

## 1. RESUMEN

Este trabajo fue realizado para determinar la estabilidad a la cocción de los inhibidores de tripsina del frijol negro (*P. vulgaris*) variedad Ostúa.

Los objetivos del trabajo fueron aislar los inhibidores, separar las formas presentes en la fracción aislada y evaluar su estabilidad al calor.

Los inhibidores fueron aislados en extracto acuoso de las semillas molidas. El extracto centrifugado y filtrado se pasó por una columna de cromatografía de afinidad, utilizando tripsina como ligando enlazado al soporte. Después de lavar la columna para remover toda la proteína sin actividad antitriptica, se procedió a eluir los inhibidores con KCl-0.1 M, pH 2. Las fracciones con actividad antitriptica fueron recolectadas, dializadas y liofilizadas. Se obtuvieron 0.0020 y 0.0029 g de inhibidor en los dos ensayos realizados, con un factor de purificación de 71.42 y 67.61, respectivamente. El producto obtenido se aplicó a un gel de electroforesis discontinua junto al extracto original, 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. Los inhibidores de tripsina probablemente sufrieron una modificación por proteólisis en la columna de separación, o las diferencias en

movilidad electroforética fueron debidas a su asociación con otras sustancias.

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. Se efectuó un ensayo de actividad antitriptica que se basa en la competencia por la tripsina de los inhibidores contra un sustrato que, al ser hidrolizado, produce coloración. 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 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.

## 2. INTRODUCCION

Las semillas de leguminosas son la mayor fuente de proteína de todos los países en desarrollo, reemplazando por su precio mas bajo a las proteínas de origen animal (1,2). También son importantes fuentes de carbohidratos, fibra dietética, minerales (potasio, fósforo, zinc y magnesio) y vitaminas (especialmente del grupo B) (3, 4).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es la semilla de leguminosa mas consumida en América latina, y constituye uno de los principales proveedores de proteína para gran parte de la población (5).

A pesar de que las leguminosas contienen 2-3 veces más proteína que los cereales (6), su digestibilidad proteínica es baja. Además, su contenido de amino ácidos azufrados es bajo y poseen sustancias antinutricionales o tóxicas (7). 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 (8, 9).

Un proceso adecuado de cocción aumenta la digestibilidad de proteínas (10, 11, 12). Este mejoramiento puede ser atribuido a varios factores, como pueden ser: la desnaturalización de proteínas, la destrucción de inhibidores de tripsina, o la reducción de taninos y ácido fítico (12). Sin embargo en algunos inhibidores de tripsina estudiados se ha observado resistencia a la desactivación por calor (13, 14).



En el presente trabajo se aislaron los inhibidores de tripsina del frijol negro (*P. vulgaris*) por cromatografía de afinidad. Se evaluó la termoestabilidad de los inhibidores de tripsina midiendo su actividad antitriptica en frijoles sometidos a distintos tiempos de cocción, así como por comparación de las bandas obtenidas por electroforesis a partir de frijoles crudos y las obtenidas a partir de frijoles cocidos.

### 3. ANTECEDENTES

La baja digestibilidad de frijoles crudos (*P. vulgaris*) fue observada en animales de laboratorio hace muchos años. El descubrimiento de inhibidores específicos de tripsina pareció ofrecer una explicación razonable a este fenómeno, pero investigaciones posteriores abrieron interrogantes sobre el rol de estos factores (15).

Las proteínas capaces de inhibir la actividad proteolítica de las enzimas digestivas son constituyentes comunes de leguminosas y otros materiales biológicos (16). Se ha encontrado actividad inhibidora esencialmente en todas las leguminosas examinadas. Sgarbieri y Whitaker midieron la actividad inhibidora de tripsina y quimotripsina de sesenta cultivos de *Phaseolus vulgaris*. Todos presentaron actividad inhibidora tanto de tripsina como de quimotripsina (10).

Muchos trabajos han sido realizados sobre la purificación y caracterización de los inhibidores de tripsina en distintos materiales de origen vegetal. En la familia Leguminosae se han purificado y caracterizado parcialmente los inhibidores de tripsina de soya, *Glycine max* (17, 18, 19, 20); frijol canavalia, *Cannavalia ensiformis* (21); frijol terciopelo, *Dolichos lablab* (22); haba, *Vicia faba* (23); frijol gandul, *Cajanus cajan* L. (24); piloy, *Phaseolus coccineus* L. (25); guisante de olor, *Lathyrus odoratus* (26); frijol mungo, *Phaseolus aureus* Roxb. (27); frijol cowpi, *Vigna sinensis* (28); frijol lima *Phaseolus*

*lunatus* (29); frijol alado, *Psophocarpus tetragonolobus* (30); arveja, *Pisum sativum* L. (31) y lenteja, *Lens culinaris* Medik (32).

De la especie *Phaseolus vulgaris* L. se han purificado y caracterizado parcialmente los inhibidores de tripsina de las variedades Great Northern (33), riñón blanco (34), francés (35), rosado brasileño Rosinha G2 (5), pinto (36) y blanco (37, 38).

### 3.1 CARACTERISTICAS DE LOS INHIBIDORES DE TRIPSINA

Los inhibidores de proteasas procedentes de leguminosas que han sido más investigados son los dos encontrados en soya. El inhibidor de Kunitz fue cristalizado en 1945 (39) y el inhibidor de Bowman Birk fue descubierto por Bowman ese mismo año (40).

El inhibidor Kunitz tiene una masa peso molecular relativa de 21.500 (41), posee dos puentes disulfuro por molécula y contiene más residuos de glicina, valina, leucina, isoleucina y arginina que el inhibidor Bowman-Birk. El inhibidor Kunitz inhibe estequiométricamente un mol de tripsina por mol. El inhibidor Bowman-Birk tiene una masa molecular relativa de 7.975 (42), es soluble en etanol acuoso al 60% (43), y contiene siete puentes disulfuro por molécula (44). Este inhibidor no contiene glicina y es relativamente pobre en valina, leucina, isoleucina y arginina. Inhibe estequiométrica y simultáneamente un mol de tripsina y un mol de quimotripsina por mol (45). Contiene arginina en ambos lados del sitio de unión con la enzima (46).

El inhibidor Bowman Birk sirve de prototipo para una familia de inhibidores, ya que muchos inhibidores aislados presentan características muy similares a éste (47, 48).

Frecuentemente, se encuentran múltiples formas moleculares de los inhibidores de proteasas. Por ejemplo, la fracción inhibidora de tripsina en frijol lima, en frijol blanco y en soya contiene 6, 5 y 8 componentes proteicos, respectivamente (30).

### 3.1.1 Composición de aminoácidos:

La composición de aminoácidos de los inhibidores aislados del género Phaseolus muestran que son muy similares al inhibidor Bowman-Birk. Comparados con otras proteínas, todos poseen un bajo porcentaje de glicina, valina, metionina, fenilalanina, tirosina y triptófano; relativamente bajo de leucina, isoleucina y treonina; y muy alto de cistina y prolina. No se han encontrado residuos libres de cisteína en los inhibidores analizados (10).

### 3.1.2 Peso molecular:

La mayor parte de inhibidores encontrados en semillas de frijol tienen un peso molecular de 8,000 a 10,000 daltons (49). Sin embargo se han reportado otros, como el inhibidor de Kunitz (17), los tres iso-inhibidores del frijol rosado brasileño (5), y el inhibidor del frijol blanco (38) con pesos mayores; pero se ha demostrado que algunos de ellos son sistemas de asociación con monómeros de peso molecular de 8,000 a 10,000 daltons (49).

### 3.1.3 Estabilidad:

Los inhibidores del frijol rosado brasileño retuvieron el 100 % de su actividad después de ser calentados a 97° C por 15 minutos, y fueron estables a pH 2 y 12 a 25° C (5). Los inhibidores del frijol lima fueron estables a calentamiento por 15 minutos a 90° C y pH 5 y 7, a almacenamiento por 24 horas a 23° C en NaOH 0.01 M y por 24 horas a 40° C en HCl 0.01 M (50). El inhibidor del frijol alado es estable de pH 1 a 8 pero se vuelve lábil a pH mayores (30).

La estabilidad de los inhibidores de tripsina ha sido atribuída a la conformación terciaria compacta determinada por el número de puentes disulfuro presentes en la molécula (9). Este es el caso por ejemplo del inhibidor Bowman-Birk, que posee puentes disulfuro más extensos y es mucho más estable al calor y a valores altos y bajos de pH que el inhibidor Kunitz (10).

### 3.1.4 Puntos isoeléctricos:

Los puntos isoeléctricos de los inhibidores de tripsina están generalmente entre el rango de 4 y 6, por ejemplo: 4.0 en el inhibidor Bowman-Birk. (42); 4.55 en el de Kunitz. (43); 5.0 en el del frijol riñón blanco, (51) y 4.7 en el del frijol terciopelo (52). En el frijol alado, de los 5 inhibidores aislados por isoelectroenfoque, 2 tienen puntos isoeléctricos con valores de 5 y 6. mientras que en los otros tres los valores son más altos, de 8.8, 9.6 y 10.2 (30).

### 3.1.5 Sitio activo:

Todos los inhibidores de tripsina pueden ser divididos en 2 grupos dependiendo del amino ácido, arginina o lisina, que se encuentra en el sitio activo. El inhibidor Bowman-Birk y el inhibidor del frijol lima, contienen una molécula de lisina; y el isochinibidor II del frijol Great Northern contiene una molécula de arginina (10).

Se ha llegado a la conclusión de que el enlace peptídico del sitio activo está presente como anillo cerrado por un puente disulfuro. Evidencia obtenida a partir de cristalografía de rayos X sugiere que las proteínas y sus inhibidores poseen estructuras complementarias y se asocian en sus complejos como moléculas rígidas (9).

En el Cuadro 1. de Anexos se presenta un resumen de las características de algunos inhibidores aislados.

## 4.2 DISTRIBUCION Y SIGNIFICADO FISIOLOGICO EN LA PLANTA

Chitra y Sadasivam (8) reportaron que 99.1% del total de actividad inhibidora se encuentra en el cotiledón. Ambe y Sohoni (59) establecieron que la mayor concentración de inhibidores se encuentra en las semillas, aunque también se encuentra en las hojas, tallos y raíces de la planta. Sin embargo, Kapoor y Gupta (60) reportaron que los inhibidores de proteasas del frijol de soya no son encontrados en otras partes

de la planta independientemente del estado de madurez. Ellos sugirieron que el inhibidor es sintetizado en la semilla con la iniciación de la formación de ésta y que no es trasladado desde otras partes de la planta a la semilla. Encontraron que el cotiledón contenía aproximadamente un 38 por ciento del total de actividad inhibidora de la semilla y que ésta no estaba presente en el embrión.

El porcentaje de inhibidores de tripsina en el total de proteína de las semillas varía dependiendo del cultivo. Por ejemplo, Whitaker y Sgarbieri (5) reportan que los inhibidores del frijol rosado brasileño contribuyen al 0.2 por ciento del total de proteína; en el frijol blanco y lima. los porcentajes reportados por Kakade (61) son de 2.6 y 2.5, respectivamente. Valores más altos son reportados por Ryan (62), del 6 por ciento; Apostolatos (57), menor del 5 por ciento; y Richardson (13), del 5 al 10 por ciento.

El significado fisiológico de los inhibidores de proteasas en semillas de frijol no es conocido. En el caso del frijol mungo se ha demostrado que el inhibidor es activo contra una proteasa encontrada en el cotiledón (27).

Es bien conocido que el nivel de inhibidores varía con las distintas etapas de crecimiento, sugiriendo que los inhibidores pueden ser fisiológicamente importantes para la planta (13). La actividad de inhibidores de proteasas contra insectos ha sido demostrada, pero varía considerablemente, especialmente por el tipo de inhibidor y la especie de insecto. (63). Ryan (62) y

Richardson (9, 13) han sugerido que los inhibidores pueden haber evolucionado como un mecanismo de defensa contra ataques de insectos y microorganismos. Ciertamente éste parece ser el caso de las papas, donde la infestación con la larva del escarabajo colorado de la papa acumula mayores cantidades de inhibidor de proteasa en las hojas que en el caso de plantas control no infestadas (64). El inhibidor presente en semillas de cowpea, que es tóxico para la larva del gorgojo *Callosobruchus maculatus*, está presente en casi el doble de la concentración en una variedad resistente al ataque de este insecto, comparada con el nivel más alto encontrado en variedades susceptibles (9).

### 3.3 SIGNIFICADO NUTRICIONAL

Muchos estudios han sido realizados sobre el efecto de alimentar a animales de laboratorio con harina de semillas crudas de frijoles cuya actividad inhibidora ha sido comprobada. Antunes y Sgarbieri (65) condujeron un estudio de 21 días en el que alimentaron ratas con harina cruda de frijoles rosados brasileños. Todas murieron antes de completarse el tiempo de experimentación. Chan y Lumen (56) encontraron que una dieta de frijol alado crudo causó la muerte de ratas después de un periodo de 12 días y atrofia del páncreas y del bazo.

La presencia de inhibidores de tripsina activos de frijol de soya en el intestino delgado incrementa la formación de una substancia que estimula marcadamente la secreción externa del



páncreas (66). Esto se debe probablemente a un esfuerzo por compensar la pérdida de proteasas debido a un acomplejamiento con los inhibidores (67). En una alimentación continua de soya cruda, el páncreas aumenta de tamaño como resultado de una hiperplasia e hipertrofia de las células pancreáticas, aparentemente porque se requiere que trabaje cada vez más con el propósito de suplir los niveles de proteasas requeridos (10, 68).

Se ha comprobado que el tratamiento térmico de los frijoles disminuye su toxicidad y mejora su calidad nutricional. Al remover los inhibidores de tripsina de la harina de soya por cromatografía de afinidad se produce un mejoramiento de un 40 por ciento en el valor nutritivo (69). Sin embargo, el mejoramiento por un tratamiento térmico también se debe a la destrucción de lectinas, substancias goitrogénicas, inhibidores de amilasa y a un aumento de la digestibilidad por desnaturalización de las proteínas (69, 70, 71, 72). Un proceso de cocción de frijoles para destruir los inhibidores de proteasas y las lectinas también conlleva problemas, pues un tratamiento prolongado de calor disminuye la digestibilidad y la disponibilidad de aminoácidos (10).

### 3.4 METODOS DE CUANTIFICACION

Los métodos para medir actividad antitriptica son principalmente colorimétricos y se basan en la medición de la inhibición de la reacción enzimática sobre un sustrato escogido

por la adición de extractos de la muestra (73). El procedimiento original fue desarrollado por Kunitz (74) y utiliza caseína como sustrato. Erlanger y colaboradores introdujeron un sustrato sintético, hidrocioruro de benzoil-DL-arginin-p-nitroanilida (BAPA), en el ensayo (75). Kakade y colaboradores, después de evaluar caseína contra BAPA, recomendaron utilizar BAPA como sustrato para el ensayo de actividad antitriptica (76). Otras modificaciones a este método incluyen las efectuadas por Smith y colaboradores, (77), Hamerstrand y colaboradores (78) y Rackis (79). Este último fue modificado por Liu y Markakis por considerar que aún tenían deficiencias en exactitud y sensibilidad, especialmente en determinaciones con actividades antitripticas bajas (80).

### 3.5 METODOS DE SEPARACION Y PURIFICACION

Kunitz (39) realizó la separación de un inhibidor de tripsina por adsorción del extracto ácido de la harina de soya en bentonita, elución con solución de piridina en agua y precipitación a pH 4.4. El precipitado fue cristalizado a pH 5.0 y 35°C y luego recristalizado.

Wang (36) recristalizó un inhibidor de tripsina del frijol rojo de acuerdo al método de Kunitz con pocas modificaciones.

Manjunath, et al. (54), aislaron los inhibidores de tripsina del mijo (*Eleusine coracana*) utilizando una columna CM-Sephadex de intercambio catiónico y una Sephadex G-50 de exclusión

molecular.

En cromatografía de intercambio aniónico se han utilizado columnas DEAE-celulosa para aislar los inhibidores de tripsina de algunos cultivos, como los tubérculos de *Colocasia antiquorum* (53) y de frijoles comunes de las variedades Great Northern (37) y blanco (38).

Los trabajos recientes sobre aislamiento y purificación de inhibidores de tripsina se han realizado aplicando cromatografía de afinidad. Carlberg y colaboradores, (55) purificaron un inhibidor de proteasa de células embrionarias de zanahoria por cromatografía de afinidad utilizando una columna empacada con tripsina-sefarosa, después de la cromatografía de intercambio aniónico en una columna DEAE-celulosa. Whitaker y Sgarbieri (5) purificaron y analizaron los inhibidores de tripsina de frijoles rosados brasileños utilizando una columna de tripsina-sefarosa, una de DEAE celulosa y una de CM-celulosa. En tubérculos de frijol alado, Mirugiswamy y Madaiah (81) efectuaron un fraccionamiento con sulfato de amonio seguido de cromatografía en una columna de tripsina-sefarosa y una columna de Sephadex QAE.

Aplicando la cromatografía de afinidad como única técnica cromatográfica, Koeppe, et al. (14), purificaron los inhibidores de tripsina de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) Chan y Lumen (30) lo efectuaron en frijoles alados y Apostolatos (57) lo hizo en 3 variedades de frijoles comunes.

La electroforesis discontinua ha sido efectuada para separar entre sí los inhibidores de tripsina del mijo (54), del amaranto

(14), y de algunas variedades de frijoles comunes (5, 33, 36, 38, 57).

#### 4. JUSTIFICACIONES

La necesidad de evaluar la calidad nutricional del frijol radica en que este alimento contribuye en alto porcentaje al contenido proteínico de la dieta de los pobladores de Guatemala, así como de otras partes de América Latina.

Se ha encontrado actividad antitriptica residual en muchas leguminosas sometidas a cocción (6,82). En frijoles negros cocidos, se han reportado valores altos de actividad residual (83).

En animales de experimentación los inhibidores de tripsina causan hipertrofia del páncreas y reducen la digestibilidad de proteínas y la disponibilidad de aminoácidos, vitaminas y minerales (57). Aún una dieta con bajos niveles de inhibidores suministrada por un largo período produce efectos fisiológicos adversos en ratas (84). La importancia de ingerir pequeñas cantidades de inhibidores de tripsina aún no se conoce en humanos.

Los métodos utilizados para medir la actividad antitriptica parecen tener deficiencias tanto en exactitud como en sensibilidad, especialmente en muestras con bajas concentraciones de inhibidor (80). Se hace entonces necesario comprobar que la actividad obtenida en muestras de frijoles cocidos se deba a la presencia de inhibidores estables y no a errores en la determinación.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 General:

5.1.1 Evaluar la termoestabilidad de los inhibidores de tripsina del frijol negro (*P. vulgaris*) v. Ostúa.

### 5.2 Específicos:

5.2.1 Aislar los inhibidores de tripsina del frijol negro (*P. vulgaris*) por cromatografía de afinidad.

5.2.2 Separar los inhibidores de tripsina del frijol utilizando técnicas electroforéticas.

5.2.3 Determinar la estabilidad de los inhibidores de tripsina por comparación de las bandas electroforéticas obtenidas a partir de frijoles crudos con las obtenidas a partir de frijoles sometidos a cuatro tiempos de cocción.

5.2.4 Medir la actividad antitriptica en frijoles crudos y en frijoles sometidos a cuatro tiempos de cocción por medio de un ensayo enzimático de competencia.

## 6. HIPOTESIS

6.1 El fíjol negro (*P. vulgaris*) v. Ostúa no contiene inhibidores de tripsina estables al proceso de cocción.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1 UNIVERSO DE TRABAJO

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

### 7.2 RECURSOS HUMANOS

El trabajo fue realizado por Julieta Eugenia Ortiz, estudiante de la carrera de Licenciatura en Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala; asesorada por los Doctores Enrique Acevedo y Omar Dary.

### 7.3 RECURSOS FISICOS

El trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá en los laboratorios de la División de Ciencias Agrícolas y en el laboratorio Especializado de Química y Bioquímica.

Para las consultas bibliográficas se utilizó la biblioteca del Incap.



## 7.4 RECURSOS MATERIALES

Balanza Analítica Ohaus Galaxy 160

Agitador magnético Corning PC-160

Bomba de Vacío Thomas Scientific Mod 5KH33DN116AX

Vortex Mixer VWR Mod K-550-G

Molino Tecator Cyclotec 1093

Baño de María Tecator 1024 Shaking Water Bath

Espectrofotómetro UV-Vis Varian DMS-90 Perkin Elmer 56

Espectrofotómetro Bausch & Lomb Espectronic 20

Columnas de 7 cm de largo y 1.4 cm de diámetro interno

Columnas PD-10 Pharmacia Fine Chemicals

Liofilizadora Virtis 10-MR-TR

Centrífuga refrigerada International Equipment Co mod PR-2

Cámara para electroforesis SE400-15-1.5 Sturdier 18 cm Vertical  
Slab Gel Unit

Fuente de Poder Electroforesis Constant Power Supply ECPS  
3000/150 Pharmacia Fine Chemicals

Estufas Twin Cooking Unit Capitol # 365

Cristalería en general

## 7.5. METODOS

### 7.5.1 Extracción de los Inhibidores de Tripsina

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

de agua destilada. El extracto fue centrifugado y filtrado.

#### 7.5.2 Preparación 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 (85), partiendo de 10 g de Sepharosa 4B activada con Bromuro de Cianógeno.

#### 7.5.3 Cromatografía 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 (30).

#### 7.5.4 Determinación de Proteína

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 determinó de acuerdo al método de Bradford (86).

#### 7.5.5 Determinación 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 (80).

#### 7.5.6 Diálisis

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

#### 7.5.7 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 por Davis (87) utilizando un gel concentrador al 3% de acrilamida y un gel separador al 7.5% de acrilamida.

#### 7.5.8 Tinción 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 (88) con las modificaciones realizadas por Koeppe y colaboradores (14). Las bandas de proteína se revelaron por tinción con Coomasie.

#### 7.5.9 Termoestabilidad

Se tomaron 5 muestras de 20 g de frijol crudo en duplicado. Luego se sometieron a cocción a 98°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 (81).

## 7.6 DISEÑO INVESTIGACION

### 7.6.1 Aislamiento de los Inhibidores

#### 7.6.1.1 Variables

Las características que se midieron en el proceso de aislamiento fueron proteína y actividad antitriptica. Estas variables fueron determinadas cualitativamente, (visualización) en las fracciones eluidas de la columna y cuantitativamente, en los extractos originales y en los productos de las cromatografías.

#### 7.6.1.2 Arreglo Experimental

7.6.1.2.1 Se utilizó un  $r = 2$  para la separación de los inhibidores por cromatografía de afinidad.

7.6.1.2.2. Se utilizó un  $r = 3$  para las determinaciones cuantitativas de proteína y actividad antitriptica.

### 7.6.1.3 Análisis de Resultados

7.6.1.3.1 Método Cualitativo de Visualización: Los datos de proteína y actividad antitriptica se presentan en forma gráfica con la variable (proteína o actividad antitriptica) contra # de fracción.

7.6.1.3.2 Método Cuantitativo: Los resultados de proteína y actividad antitriptica (UTI/mg muestra), se presentan en forma tabulada junto al total de actividad, actividad específica (actividad/mg proteína) y factor de purificación.

### 7.6.2 Evaluación de la Termoestabilidad de los Inhibidores

7.6.2.1 La característica que se midió fue la presencia o ausencia de inhibidores de tripsina en cada uno de los 5 tiempos de cocción.

Esta variable fue determinada de dos formas:

7.6.2.1.1 Cualitativa: en el gel de electroforesis.

7.6.2.1.2 Cuantitativa: utilizando la técnica espectrofotométrica de actividad antitriptica en los extractos.

### 7.6.2.2 Arreglo Experimental

7.6.2.2.1 Se utilizó un  $r = 2$  para la electroforesis.

7.6.2.2.2 Se utilizó un  $r = 3$  para la medición de actividad antitriptica.

### 7.6.3 Análisis de Resultados

7.6.3.1 Método Cualitativo: Los resultados se escribieron en forma descriptiva. Se indicó la presencia o ausencia de bandas de inhibidor en el gel de electroforesis para cada uno de los cinco tiempos de cocción.

7.6.3.2 Método Cuantitativo: Los resultados se escribieron en forma tabulada indicando la actividad antitriptica (expresada como unidades de inhibición/mg muestra) contra tiempo de cocción (min).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Del producto obtenido por cromatografía de afinidad, dializado (para remover sales) y luego liofilizado, se obtuvieron 0.0020 y 0.0029 g para cada una de las purificaciones realizadas. Los datos de la purificación aparecen en el cuadro 2.

Las curvas de elución de proteína de las dos cromatografías de afinidad se presentan en la figura 1. Después de asegurar la ausencia de proteína, (frac. 27-50 y 34-50 para la I y II cromatografías, respectivamente) se procedió a eluir con KCL 0.1 M, pH 2 para obtener los inhibidores de tripsina. Los picos de inhibición para las fracciones 50-75 de la I y II cromatografías, se presentan junto a los picos de proteína, en las figuras 2 y 3, respectivamente. Se eluyeron 25 alícuotas de 5 ml. Se obtuvo un pico grande de proteína para ambas cromatografías que coincide exactamente con el pico de inhibidor. Los picos que se observan después, tanto de inhibidor como de proteína, posiblemente se deben a errores inherentes a los métodos de cuantificación utilizados y no guardan ninguna correlación entre sí.

Se recolectaron las fracciones que presentaban actividad antitriptica (51-53 y 51-54) para las cromatografías I y II, respectivamente.

## 8.2 ELECTROFORESIS

### 8.2.1 Purificación del inhibidor

El producto de la cromatografía de afinidad se corrió junto al extracto original para verificar si se había dado alguna modificación en el inhibidor por proteólisis en la columna y para detectar la presencia de proteínas contaminantes. Los geles obtenidos fueron revelados por tinción cromática, que muestra únicamente las bandas con actividad antitriptica y por tinción con Coomasie, que muestra las bandas correspondientes a proteína.

En la figura 4 se presentan los patrones revelados para proteína de los extractos originales comparados con el producto obtenido por cromatografía de afinidad. Se observa que en el producto de separación se han removido todas las proteínas de alto peso molecular a excepción de una porción que no entró al gel de separación.

En la misma figura 4 se comparan los patrones proteínicos, (bandas oscuras, fondo claro) del los extractos originales y los productos de separación de la cromatografía de afinidad contra los respectivos patrones de inhibición (bandas claras, fondo oscuro). Aunque los patrones de proteína se observan difusos, se puede notar que las bandas proteínicas del extracto coinciden con el patrón de inhibición del mismo. Sin embargo, el patrón de inhibición del producto de la cromatografía no coincide con el patrón de inhibición del extracto original, como puede apreciarse en el diagrama presentado en la figura 5. Se obtuvieron 6 bandas



de actividad antitriptica en el producto de las cromatografias y 7 en el extracto original.

### 8.3. TERMOESTABILIDAD

#### 8.3.1 Metodo cuantitativo

Los valores obtenidos de actividad antitriptica medida de acuerdo a la técnica espectrofotométrica de Liu y Markakis para los frijoles sometidos a 0, 30, 60, 90 y 120 min de cocción, se presentan en el cuadro 3 e indican que a los 30 min ya han sido destruidos.

#### 8.3.2 Metodo cualitativo

En las figuras 6 y 7 se presentan los patrones de inhibición de los extractos de frijoles a 0, 30, 60, 90 y 120 min de cocción. Se observa el mismo patrón electroforético del extracto, obtenido en los geles anteriores teñidos por actividad (fig. 4), para el tiempo de 0; mientras que para los tiempos de 30, 60, 90 y 120, no se obtuvieron bandas de inhibición.

## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

Los factores de purificación obtenidos para los experimentos I y II, fueron de 71.42 y 67.61, respectivamente. Estos valores fueron determinados dividiendo la actividad específica (unidades de inhibición/mg de proteína) del producto, dentro de la actividad específica del extracto original. 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 (84). 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) (5). Wu y Whitaker reportaron un factor de 30.8 en la purificación de inhibidores de tripsina de frijoles riñón (58).

Los rendimientos de las purificaciones realizadas fueron bajos 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 II) pero que no tienen actividad antitriptica no se observan en el producto, a excepción de una muy débil que no entró 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 (5, 31, 84). 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 (5, 31). Las cantidades de inhibidor obtenidos, (0.0020 y 0.0029 g para la Ia y IIa 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. El extracto original también presenta esta multiplicidad, revelándose 7 bandas con actividad antitriptica. La presencia de varios isoinhibidores en distintos materiales ha sido ampliamente documentada. Por ejemplo, la fracción de inhibidores de tripsina de las semillas de amaranto contiene 13 isoinhibidores (14); la de frijol blanco, 11 (84); la de soya, frijol alado y frijol rosado, 8 (30, 56, 62); la de frijol lima, 6 (29); la de frijol riñón, 4 (58) y la de frijol pinto y lenteja, 2 (32, 36). En estudios sobre la estructura primaria de los inhibidores se revela un alto grado de homología entre ellos, conteniendo secuencias repetitivas o regiones de homología interna, que podrían haber resultado de la extensión

de cadenas cortas de polipéptidos por un proceso de duplicación genética (9). Se ha reportado la posibilidad de que nuevas especies de isoINHIBIDORES sean producidas en la semilla durante la germinación (29, 89). Los nuevos isoINHIBIDORES son producidos después de la hidrólisis de los residuos terminales de aminoácidos a partir de un inhibidor de tripsina mayor (89).

Por otro lado, se ha observado que los inhibidores de tripsina de bajo peso molecular pueden asociarse entre sí (9, 31, 38, 57, 84) produciendo dímeros, trímeros o tetrameros, lo que complica la estimación del número de formas presentes (90). El patrón electroforético del inhibidor de tripsina obtenido por cromatografía difiere al del extracto original. En los geles teñidos por tinción cromática (actividad antitriptica) de la figura 4, se puede observar que en el producto de la cromatografía se observan dos bandas muy intensas en el extremo inferior del gel. Estas bandas podrían corresponder a las bandas 1 y 2 del extracto, en donde se revelan con menor intensidad (la banda 2 es apenas perceptible). En cambio, las bandas 3, 4 y 5, del extracto se presentan con menor intensidad en el producto de la cromatografía. En el producto de la cromatografía se observa una banda que parece coincidir con la banda 6 del extracto, con la diferencia de que en el extracto ésta se presenta con menor intensidad, apenas perceptible. Por último, la banda 7 del extracto parece ya no estar presente en el producto de la cromatografía. 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 (36, 38, 81). De acuerdo a esta explicación, los componentes 3, 4, 5 y 7 del extracto original podrían haber sufrido rompimiento, produciéndose moléculas más pequeñas que representarían las bandas 1, 2 y 6 del producto de la cromatografía. Las bandas débiles obtenidas en el producto de la cromatografía podrían también significar que una porción de los componentes iniciales probablemente sufrió alguna modificación en su estructura con la consecuente disminución de actividad.

Otra explicación para la variación en los patrones electroforéticos del extracto original y el producto de la cromatografía se basa en el hecho de que los inhibidores poseen distintas actividades contra la enzima sobre la cual actúan (31, 33). Podría ser que al entrar en la columna, los inhibidores compitieran entre sí por la enzima, de una manera similar que compiten con otros sustratos. Posiblemente los inhibidores que poseyeran mayor actividad hacia dicha enzima se fijarían a ella en mayor proporción en comparación con otros de menor actividad. Este podría ser entonces el caso de los componentes 1, 2 y 6 del extracto, que a pesar de encontrarse aparentemente en menor

concentración, por poseer una mayor actividad se habrían fijado a la columna en mayor proporción. De los demás componentes, una parte posiblemente no sería fijada mientras que otra lo sería pero en menor proporción.

Las bandas electroforéticas con actividad antitriptica del extracto original podrían también ser, como se menciona anteriormente, asociaciones (dímeros, trímeros y tetrameros) de uno o más inhibidores. Estos podrían haberse disociado en cierto porcentaje al pasar por la columna (ya sea por hidrólisis triptica u otras modificaciones), produciéndose así, un arreglo distinto en el patrón electroforético del producto de la cromatografía.

Por último, las diferencias en movilidad electroforética entre el extracto original y el producto de la cromatografía podrían deberse a la posibilidad de que estén asociadas con otras sustancias, produciéndose así diferencias en carga y/o peso.

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 inhibidora en preparaciones de habas cocidas (91). Otros investigadores han reportado una reducción substancial de actividad antitriptica en frijoles remojados y cocinados por 30 minutos (65, 84, 92). 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 (32).

La mayor parte de publicaciones donde se reporta estabilidad térmica de los inhibidores se refiere a análisis en el inhibidor puro (54, 93, 94, 95, 96). Los inhibidores de tripsina no son consumidos en forma pura. Estas proteínas se comportan de otra manera cuando los frijoles son cocidos en un ambiente más complejo (11). La inestabilidad térmica de los inhibidores a partir de frijoles enteros preparados por procesos convencionales de cocción comparada con los inhibidores puros probablemente se debe a otros compuestos de la semilla en este proceso de desactivación (32). Estos podrían ser tioles, que están presentes en las semillas y de los que se ha comprobado que participan en la desactivación térmica de los inhibidores de tripsina de soya (97). Otros autores reportan que los inhibidores de tripsina en forma pura son estables al calor pero no lo son en presencia de ciertas sustancias de alto peso molecular (98, 99).

Aunque en este estudio no se determinó el tiempo exacto en que los inhibidores de tripsina son destruidos por una cocción a presión atmosférica, dicha actividad ya no fue detectada a partir de los 30 min de cocción. Sin embargo, estos frijoles estuvieron listos para ser consumidos (textura suave al ser comprimidos con los dedos) hasta los 120 min de cocción. De acuerdo a estos resultados, un proceso convencional de cocción efectivamente

destruye la actividad de los inhibidores contra la tripsina, como también ha sido demostrado por otros autores (6, 32, 100).

Al comprobarse que en frijoles cocidos, los inhibidores no ejercen actividad contra la tripsina, su efecto como agentes antinutricionales es anulado. Estos compuestos podrían mas bien ser beneficiosos por su alto contenido de cistina (6, 10, 33, 36, 60). Siendo los frijoles deficientes en aminoácidos 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 mas resistentes.



## 10. CONCLUSIONES

10.1 De acuerdo a las condiciones electroforéticas utilizadas, la fracción de inhibidores de tripsina del frijol negro de la variedad estudiada es múltiple y se separa en siete bandas con actividad antitriptica.

10.2 El frijol negro (*P. vulgaris*) no contiene inhibidores de tripsina estables al proceso de cocción.

## 11. RECOMENDACIONES

11.1 Para determinaciones de proteína en muestras de inhibidores de tripsina se recomienda utilizar un método distinto al de Bradford, pues este utiliza Azul de Coomasie, reactivo que es poco sensible para inhibidores de tripsina. Esto se debe a que los grupos que reaccionan con el Azul de Coomasie son aminoácidos básicos (lisina y arginina) los cuales están presentes en muy bajo contenido en los inhibidores de tripsina (84, 101).

11.2 Para revelar bandas de proteína de inhibidores de tripsina también se recomienda usar otro reactivo, por ejemplo nitrato de plata, en lugar del Azul Brillante de Coomasie, para aumentar la sensibilidad del ensayo.

11.3 Para anular la posibilidad de que ocurra una proteólisis en la columna, se recomienda usar anhidrotripsina, de la misma manera que Rayas Duarte, Bergeron y Nielsen (84).

## 12. REFERENCIAS

1. Kaur D, Kapoor AC. Nutritional Composition and Antinutritional Factor of Rice Bean (*Vigna Umbellata*). Food Chem 1992;43:119.
2. Apata DF, Ologhobo AD. Biochemical Evaluation of Some Nigerian Legume Seeds. Food Chem 1994;49:333.
3. Meiners CR, et al. Proximate Composition and Yield of Raw and Cooked Mature Dry Legumes. Food Chem 1976;24:1122-1126.
4. Sathe SK, Idokuraine A, Weber CW. Purification and Biochemical Characterization of Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Major Globulin. Food Chem 1994;50:261.
5. Whitaker JR, Sgarbieri VC. Purification and Composition of the Trypsin-Chymotrypsin Inhibitors of *Phaseolus vulgaris* L. var Rosinha G2. J Food Biochem 1981;5:197-213.
6. Liener IE. Legume Toxins in Relation to Protein Digestibility, A Review. J Food Sci 1976;41:1078.
7. Peace RW, et al. Effects of Storage on Protein Nutritional Quality of Grain Legumes. J Food Sci 1988;53:439.
8. Chitra R, Sadasivam S. A Study of the Trypsin Inhibitor of Black Gram. Food Chem 1986;21:315-320.
9. Richardson M. Protein Inhibitors of Enzymes. Food Chem 1980;6: 235-253.
10. Sgarbieri VC, Whitaker JR. Protein of Digestive Enzymes. Adv Food Res 1982;28:128-166.
11. Desphande SS, Nielsen SS. In vitro Enzymatic Hydrolysis of Phaseolin, the Major Storage Protein of *Phaseolus Vulgaris* L. J Food Sci 1987;52:1326.
12. Khalil AH, Mansour EH. The Effect of Cooking, Autoclaving and Germination on the Nutritive Quality of *Faba Beans*. Food Chem 1995;54:180.
13. Richardson M. The Proteinase Inhibitors of Plants and Microorganisms. Phytochemistry 1977;16:159-169.
14. Koeppe SJ, et al. Isolation and Heat Stability of Trypsin Inhibitors in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*). J Food Sci 1985;50:1519-1521.

15. Seidl D, Jaffé M, Jaffé WG. Digestibility and Proteinase Inhibitory Action of a Kidney Bean Globulin. *J Agr Food Chem* 1969;17:1318.
16. Liener IE. Legume Toxins in Relation to Protein Digestibility -A Review. *J Food Sci* 1976;41:1076.
17. Kunitz M. Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor. *J Gen Physiol* 1946;29:1549-154.
18. Birk Y. Purification and Some Properties of a Highly Active Inhibitor of Trypsin and  $\alpha$ -Chymotrypsin from Soybeans. *Biochem Biophys Acta* 1961;54:378-381.
19. Wu YV, Scheraga HA. Studies of Trypsin Inhibitor. I. Physicochemical Properties. *Biochem* 1962;1:698-705.
20. Birk Y, Gertier A, Khalef S. A Pure Trypsin Inhibitor from Soya Beans. *Biochem J* 1963;87:281-284.
21. Ubatuba FB. Occurrence of a Trypsin Inhibiting Factor in the Seeds of *Cannavalia ensiformis*. *Rev Bras Biol* 1955;15:1-8.
22. Sohonie K, Ambe KS. Crystalline Trypsin Inhibitors from the Indian Field Bean and the Double Bean. *Nature* 1955;175:508-509.
23. Warsy AS, Norton G, Stein M. Protease Inhibitors from Broad Bean. Isolation and Purification. *Phytochemistry* 1974;13:2481-2486.
24. Tawde S. Isolation and Partial Characterization of *Cajanus cajan* Trypsin Inhibitor. *Ann Biochem Exp Med* 1961;21:359-366.
25. Weder JKP, Kassubek A, Hory HD. Trypsin and Chymotrypsin Inhibitors in Leguminosae. V. Isolation and Characterization of Some Inhibitors from *Phaseolus coccineus*. *Chem Mikrobiol Technol Lebensm.* 1975; 4:79-84.
26. Weder J, Betitz HD. Trypsin and Chymotrypsin Inhibitors in Foods. *Dtsch Lebensm Rundsch* 1969;65:78-83.
27. Baumgartner B, Chrispeels MJ. Partial Characterization of a Protease Inhibitor which Inhibits the Major Endopeptidase Present in the Cotyledons of Mung Beans. *Plant Physiol* 1976;58:1-6.
28. Ventura MM, Filho XJ. A Trypsin and Chymotrypsin from Black Eyed Pea (*Vigna sinensis*). I. Purification and Partial Characterization. *Ann Acad Bras Cienc* 1967;38:553-566.
29. Jones G, Moore S, Stain WH. Properties of Chromatographically Purified Trypsin Inhibitors from Lima Beans.

- Biochemistry 1963;2:66-61.
30. Chan J, de Lumen BO. Properties of a Trypsin Inhibitor from Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) Seed Isolated by Affinity Chromatography. J Agric Food Chem 1982;30:42-46.
  31. Gaborit T, et al. Trypsin Inhibitors from *Pisum sativum* L. Exhibit Identical Epitopes. J Sci Food Agric 1989;48:15-27.
  32. Mueller R, Weder JKP. Isolation and Characterization of Two Trypsin-Chymotrypsin Inhibitors from Lentil Seeds. J Food Biochem 1989;13:39-63.
  33. Wilson KA, Laskowski M. Isolation of Three Isoinhibitors of Trypsin from Garden Bean, *Phaseolus vulgaris*, Having Either Lysine or Arginine at the Reactive Site. J Biol Chem 1973;248:756.
  34. Pustzai A. The Isolation of Two Proteins, Glycoprotein I and a Trypsin Inhibitor from the Seeds of Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*). Biochem J 1967;94:611-616.
  35. Belitz HD, et al. Proteinase Inhibitors of *Phaseolus vulgaris* var. nanus: Isolation and Comparison with Inhibitors of Other *Phaseolus* Species. Z Lebensm-Unters-Fdsch 1973;152:129-133.
  36. Wang D. A Crystalline Protein-Proteinase Inhibitor from Pinto Bean Seeds. Biochim Biophys Acta 1975;393:583-596.
  37. Wagner LP, Riehm JP. Purification and Partial Characterization of a Trypsin Inhibitor Isolated from the Navy Bean. Arch Biochem Biophys 1975;169:42-50.
  38. Whitley EJ Jr., Bowman DE. Isolation and Properties of a Navy Bean Proteinase Inhibitor Component I. Arch Biochem Biophys 1975;169:42-50.
  39. Kunitz M. Crystallization of a Trypsin Inhibitor from Soybean. Science 1945;101:668-669.
  40. Bowman DE. Amylase Inhibitor of Navy Beans. Sci 1945;102:358-359.
  41. Yamamoto M, Ikenaka T. Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. I. Purification and Characterization of Two Trypsin Inhibitors. J Biochem (Tokio) 1967;62:141-149.
  42. Odani S, Ikenaka T. Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. IV. Complete Amino Acid Sequence and the Antiproteinase Sites of Bowman-Birk Soybean Proteinase Inhibitor. J Biochem

1972;71:839-848.

43. Pustzai A, Watt WB, Stewart JC. A Comprehensive Scheme for the Isolation of Trypsin Inhibitors and the Agglutinin from Soybean Seeds. *J Agric Food Chem* 1991;39:862-866.
44. Odani S, Ikenaka T. Scission of Soybean Bowman-Birk Proteinase Inhibitor Into Two Small Fragments Having Either Trypsin or Chymotrypsin Inhibitory Activity. *J Biochem* 1973;74:857-860.
45. Odani S, Ikenaka T. The Amino Acid Sequence of Two Soybean Double Headed Proteinase Inhibitors and Evolutionary Consideration on the Legume Protein Inhibitors. *J Biochem* 1976;80:641-643.
46. Odani S, Ikenaka T. Studies on Soybean Inhibitors. XII. Linear Sequences of Two Soybean Double Headed Trypsin Inhibitors, D-II and E-I. *J Biochem* 1978;83:737-745.
47. Wu C, Whitaker JR. Homology among Trypsin/Chymotrypsin Inhibitors from Red Bean, Brazilian Pink Bean and Soybean. *J Agric Food Chem* 1991;39:1583-1589.
48. Van der Poel FHM, Tamminga AFB. The Presence and Inactivation of Trypsin Inhibitors, tannins, lectins and amylase Inhibitors in Legume Seeds during Germination, a Review. *Plant Foods Hum Nutr* 1992;42:71-85.
49. Filho JX, De Azevedo M R. Visualization of Proteinase Inhibitors in SDS-Polyacrylamide Gels. *Anal Biochem* 1978;84:296-303.
50. Fraenkel-Conrat H, et al. Isolation and Characterization of a Trypsin Inhibitor from Lima Beans. *Arch Biochem Biophys* 1952;37:393-407.
51. Pustzai A. General Properties of a Protease Inhibitor from the Seeds of Kidney Beans. *Eur J Biochem* 1968;5:252-259.
52. Banerji AP, Sohoni K. Trypsin Inhibitor from Field Beans (*Dolichos lablab*). Isolation, Purification and Properties of a Trypsin Inhibitor from Field Beans. *Enzymol* 1969;36:137-152.
53. Sumathi S, Pattabiram TN. Natural Plant Enzyme Inhibitors. IV. Studies on Trypsin Inhibitors of *Colocasia antiquorum* Tubers. *Biochim et Biophys Acta* 1979;556:115-127.
54. Manjunath NH, et al. Isolation and Characterization of a Trypsin Inhibitor from Finger Millet. *Phytochem* 1983;22:2349-2357.

55. Carlberg I, et al. Purification of a Trypsin Inhibitor Secreted by Embryogenic Carrot Cells. *Plant Physiol* 1987;84:187-290.
56. Chan J, Lumen BO. Biological Effects of Isolated Trypsin Inhibitor from Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) on Rats. *J Agric Food Chem* 1982;30:46-50.
57. Apostolatos G. Nutritional Significance of Trypsin Inhibitors from Edible Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Food Tech* 1984;19:561-567.
58. Wu C, Whitaker JR. Purification and Partial Characterization of Four Trypsin/Chymotrypsin Inhibitors from Red Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris* var. Linden). *J Agric Food Chem* 1990;38:1523-1529.
59. Ambe KS, Sohoni K. Trypsin Inhibitor in Plant Metabolism. *Experientia* 1956;12:302-303.
60. Kapoor AC, Gupta YP. Trypsin Inhibitory Activity in Soybean Seeds as Influenced by Stage of its Development and Different Treatments, and the Distribution in its Anatomical Parts. *Indian J Nutr Diet* 1978;15:429-433.
61. Kakade ML. Biochemical Basis for the Differences in Plant Protein Utilization. *J Agr Food Chem* 1974;22:550-555.
62. Ryan CA. Proteolytic Enzymes and their Inhibitors in Plants. *Annu Rev Plant Physiol* 1973;24:173-196.
63. Marconi E, Ng NQ, Carnovale E. Protease Inhibitors and Lectins in Cowpea. *Food Chem* 1993;47:39.
64. Green TR, Ryan CA. Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves: A Possible Defense Mechanism Against Insects. *Science* 1972;175:776-777.
65. Antunes PL, Sgarbieri VC. Effect of Heat Treatment on the Toxicity and Nutritive Value of Dry Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) variety Rosinha G2. *J Food Sci* 1979;44:1703-1706.
66. Khayambashi H, Lyman RL. Secretion of Rat Pancreas Perfused with Plasma from Rats Fed Soybean Trypsin Inhibitor. *Am J Physiol* 1969;217:646-651.
67. Lyman RL, Olds BA, Green GM.  $\alpha$ -Chymotrypsin in the Intestine of Rats Fed Soybean Trypsin Inhibitor and its Inability to Suppress Pancreatic Enzyme Secretion. *J Nutr* 1974;104:105-110.
68. Tan NH, Wong KC. Thermal Stability of Trypsin Inhibitor

- Activity in Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*). Am Chem Soc 1982;30:1140-1143.
69. Kakade ML, et al. Contribution of Trypsin Inhibitors to the Deleterious Effects of Unheated Soybeans Fed to Rats. J Nutr 1973;103:1772-1778.
70. Racki JJ. Biological and Physiological Factors in Soybeans. J Am Oil Chem Soc 1974;51:161A-174A.
71. Boonvisut S, Whitaker JR. Effect of Heat, Amylase and Disulfide Bond Cleavage on the in vitro Digestibility of Soybean Proteins. J Agric Food Chem 1976;24:1130-1135.
72. Savaino DA, et al. The Effect of an  $\alpha$ -amylase Inhibitor on the Growth Rate of Weanling Rats. Nutr Rep Int 1977;15:443-449.
73. Bacon JR, et al. A Microassay for the Analysis of Trypsin Inhibitor Activity in Peas. Food Chem 1995;52:77-78.
74. Kunitz M. Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor II: General Properties. J Gen Physiol 1947;30:291-310.
75. Erlanger BF, Kokawasky N, Cohen W. The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substances of Trypsin. Arch Biochem Biophys 1961;95:271-278.
76. Kakade MI, Simons N, Liener IE. An Evaluation of Natural vs Synthetic Substances for Measuring the Antitryptic Activity of Soybean Samples. Cereal Chem 1969;46:518-526.
77. Smith C. et al. The Determination of Trypsin Inhibitor Levels in Foodstuffs. J Sci Food Agric 1980;31:341-350.
78. Hamerstrand GE, Black LT, Glover JD. Trypsin Inhibitors in Soy: Modification of the Standard Analysis Procedure. Cereal Chem 1981;58:42-45.
79. Rackis JJ, Gumbmann MR, Liener IE. The USDA Trypsin Inhibitor Study. I Background, Objectives, and Procedural Details. Qual Plant Foods Hum Nutr 1985;35:213-242.
80. Liu K, Markakis P. An Improved Colorimetric Method for Determining Antitryptic Activity in Soybean Products. Cereal Chem 1989;66:415-422.
81. Murugiswamy B, Madaiah M. Trypsin Inhibitors of Winged Bean Tubers (*Psophocarpus tetragonolobus*): Purification and Properties. J Food Biochem 1989;13:253-269.
82. Estévez AM, et al. Effect of Processing on some Chemical



- and Nutritional Characteristics of Pre-cooked and Dehydrated Legumes. *Plant Foods Hum Nutr* 1991;41:193-201.
83. Elías LG, De Fernández DG, Bressani R. Possible Effects of Seed Coat Polyphenolics on the Nutritional Quality of Bean Protein. *J Food Sci* 1979;44:524-527.
84. Rayas Duarte P, Bergeron D, Nielsen SS. Screening of Heat-Stable Trypsin Inhibitors in Dry Beans and Their Partial Purification from Great Northern Beans (*Phaseolus vulgaris*) Using Anhydrotrypsin-Sepharose Affinity Chromatography. *J Agric Food Chem* 1992;40:32-42.
85. Pharmacia Fine Chemicals. Affinity Chromatography, Principles and Methods. Suecia: Pharmacia Fine Chemicals. 1979. 112p. (p. 14-18).
86. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
87. Davis BJ. Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. *Ann NY Acad Sci* 1964;121:404-427.
88. Uriel J, Berges J. Characterization of Natural Inhibitors of Trypsin and Chymotrypsin by Electrophoresis in Acrylamide-Agarose Gels. *Nature* 1968;218:578-580.
89. Lorensen E, Prevosto R, Wilson K. The Appearance of New Active Forms of Trypsin Inhibitor in Germinating Mung Bean (*Vigna radiata*) Seeds. *Plant Physiol* 1981;68:88-92.
90. Laskowski M, Kato I. Protein Inhibitors of Proteinases. *Ann Rev Biochem* 1980;49:593-626.
91. Hamza MA, El-Tabey Shehata AM, Stegemann H. Studies on  $\alpha$ -amylase and Trypsin Inhibitors in Legume Seeds Using Agar Diffusion and Isoelectric Focusing Technics. *Qual Plant Foods Hum Nutr* 1986;36:(139-146).
92. Dhurandhar NV, Chang KS. Effect of Coking on Firmness, Trypsin Inhibitors, Lectins, and Cystine/Cystine Content of Navy and Red Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*). *J Food Sci* 1990;55:470-474.
93. Shivaraj B, Pattabiraman TN. Natural Plant Enzyme Inhibitors. Characterization of an Unusual  $\alpha$ -Amylase/Trypsin Inhibitor from Ragi (*Eleusine coracana* Geartn.) *Biochem J* 1981;193:29.
94. Tsukamoto I, Miyoshi M, Hamaguchi Y. Purification and

Characterization of Three Inhibitors from Beans, *Phaseolus vulgaris* kintoki. Cereal Chem 1983;60:281.

95. Udupa S, Pattabiraman TN. Natural Plant Enzyme Inhibitors. Studies on a Proteinase Inhibitor from Italian Millet (*Setaria italica*). J Sci Food Agric 1984;35:679.

96. Ikeda K, Kusano, T. Purification and Properties of the Trypsin Inhibitors from Buckwheat Seeds. Agric Biol Chem 1983;47:1481.

97. Ellenrieder G, Blanco S, Bondoni A. Thermal Inactivation of Trypsin Inhibitors in Aqueous Extracts of Soybeans. Studies on Substances that Accelerate Inactivation. Cereal Chem 1981;58:291-293.

98. Ellenrieder G, Geronazzo H, DeBojarski AB. Thermal Inactivation of Trypsin Inhibitors in Aqueous Extract of Soybean, Peanuts and Kidney Beans: Presence of Substances that Accelerate Inactivation. Cereal Chem 1980;57:25-27.

99. Tsukamoto I, Miyoshi M, Hanaguchi Y. Heat Inactivation of Trypsin Inhibitor of Kintoki Bean (*Phaseolus vulgaris*). Cereal Chem 1983;60:194-197).

100. Sathe SK, Salunkhe DK. Technology of Removal of Unwanted Componentes of Dry Beans. Food Sci Nutr 1984;21:263-287.

101. Merril CL. Gel Staining Techniques. Methods Enzymol 1990;182:477-495.

## 13. ANEXOS

Cuadro 1. Resumen de características de algunos inhibidores aislados de diferentes especies

| Fuente   | Peso Molecular     | Punto Iso-eléctrico   | N Iso-inhibidores | Contenido Aminoácidos                                      | Estabilidad a pH | Estabilidad a T°                                 |
|--|--------------------|-----------------------|-------------------|--|------------------|--|
| <i>Amarantus hipocondriacus</i><br>(14)        |                    |                       | 13                |  |                  | 20%<br>7hr<br>100°C                              |
| <i>Colocasia antiquorum</i> (53)               | 40,000             |                       | 3                 |  | 1.9-12.7         | 0%<br>20 min<br>95°C                             |
| <i>Eleusine coracana</i><br>(54)               | 12,000             |                       | 2                 | no cis.<br>glu, pli,<br>val, ala,<br>leu, %cis.<br>aa bas. |                  | 0%<br>autoclave                                  |
| <i>Daucus carota</i><br>(55)                   | 12,800             |                       |                   |  |                  | 50%<br>15 min<br>100°C                           |
| <i>Pisum sativum</i><br>L.<br>(31)             | 12,000 -<br>13,000 |                       | 4                 |  |                  |  |
| <i>Lens culinaris</i><br>Medik<br>(52)         | 9,900 -<br>10,600  | 5.35, 7.70            | 2                 | aa ácidos y<br>% cis.<br>no met, trip.                     | 1.5              | 22-43%<br>45 min<br>100°C<br>0%<br>2 hr<br>100°C |
| <i>Psephocarpus tetragenolobus</i><br>(30, 56) | 14,000 -<br>24,000 | 5, 6, 8,<br>9.6, 10.2 | 2                 | aa ácidos,<br>pro, ser.<br>met.                            |                  | 10%<br>60 min<br>100°C                           |

| Fuente  | Peso Molecular     | Punto Iso-eléctrico | # Iso-inhibidores | Contenido Aminoácidos                                     | Estabilidad a pH | Estabilidad a T°            |
|---|--------------------|---------------------|-------------------|---|------------------|-----------------------------|
| <i>Phaseolus lunatus</i> (29)                     | 10,000             |                     | 4                 | aa ácidos, ser, ½ cis. gli, val, tir. no met, trip.       |                  |                             |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> var Pinto (36)          | 9,100<br>10,000    |                     | 2                 |   | 1.5 - 12         |                             |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> var Swedish Brown (57)  | 10,000 -<br>21,000 |                     | 8                 | ½ cis. met.   |                  | 10% autoclave               |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> var Kosinha 62 (5)      | 20,000             |                     | 4                 | ser, tre, pro, ½ cis. glu, ala, leu. no trip, val. 1 met. |                  |                             |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> var Great Northern (33) | 9,100 -<br>9,300   |                     | 3 - 11            | asp, ser, ½ cis. val, met, tir, fen.                      |                  | 2.5 - 5%<br>30 min<br>100°C |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> var Linden (58)         | 18,800 -<br>20,400 | 4.46 -<br>5.09      | 4                 | ser, asp, pro, ½ cis. gli, ala, arce. no met, trip.       |                  |                             |

**Cuadro 2. Datos de la Purificación de los Inhibidores de Tripsina del frijol negro (*P. vulgaris*)**

| Fracción    | Peso total<br>(mg) | Proteína total<br>(mg) | Actividad Antitrip-<br>tica<br>(UTI/mg) | Actividad Antitrip-<br>tica total<br>(UTI) | Actividad Específica<br>(UTI/mg p) | Factor de Purificación | Rendimiento<br>(%) |
|-------------|--------------------|------------------------|---|--|------------------------------------|------------------------|--------------------|
| Extracto I  | 20,032.00          | 3,193.10               | 122.5                                   | 2,453,920.00                               | 768.51                             | 1                      | 100.00             |
| Producto I  | 2.00               | 0.22                   | 6,037.5                                 | 12,075.00                                  | 54,886.36                          | 71.42                  | 0.49               |
| Extracto II | 20,040.00          | 3,222.43               | 126.4                                   | 2,533,656.00                               | 786.07                             | 1                      | 100.00             |
| Producto II | 2.90               | 0.27                   | 4,948.3                                 | 14,350.01                                  | 53,148.19                          | 67.61                  | 0.57               |

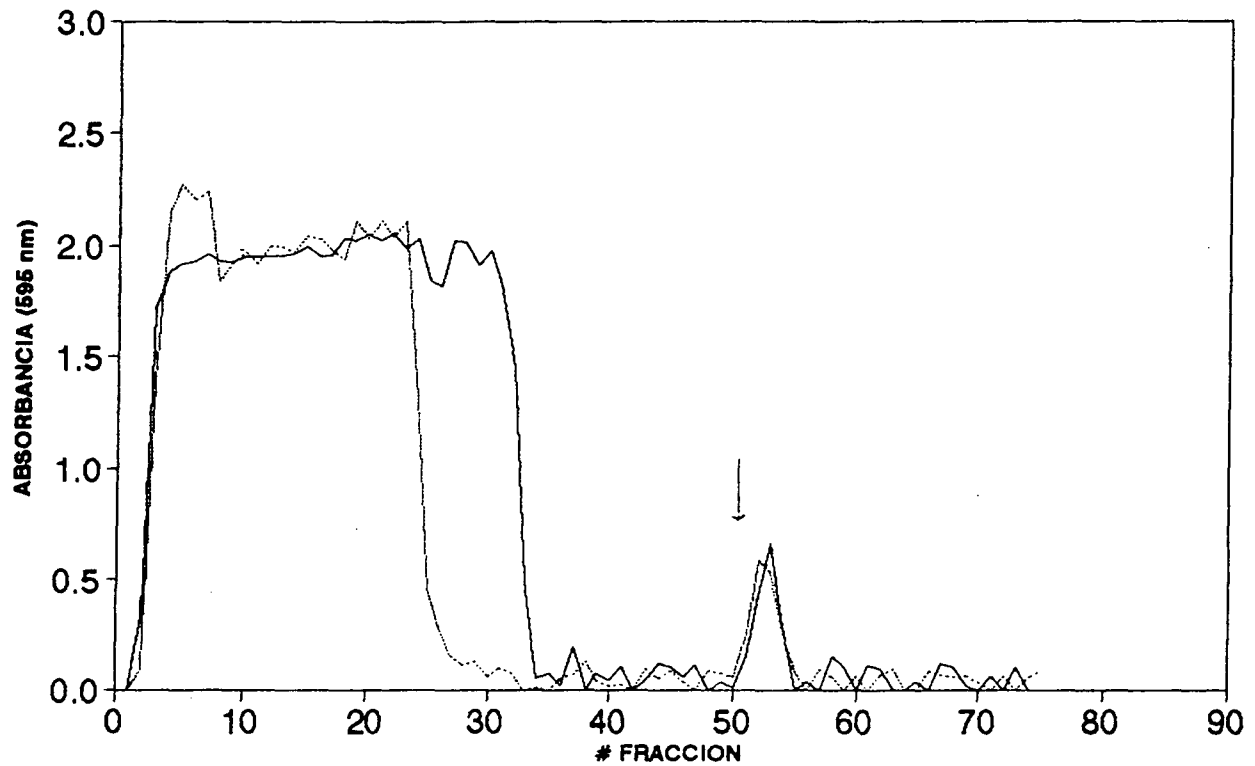
Donde UTI = incremento de 0.001 en unidades de absorbancia a 410nm.

Cuadro 3. Actividad antitriptica de frijoles cocidos a 0, 30, 60, 90 y 120 minutos a Presión Atmosférica.

| Tiempo de cocción<br>(min) | Actividad Antitriptica<br>(UTI/mg) |
|----------------------------|------------------------------------|
| 0                          | 124.45                             |
| 30                         | nd*                                |
| 60                         | nd                                 |
| 90                         | nd                                 |
| 120                        | nd                                 |

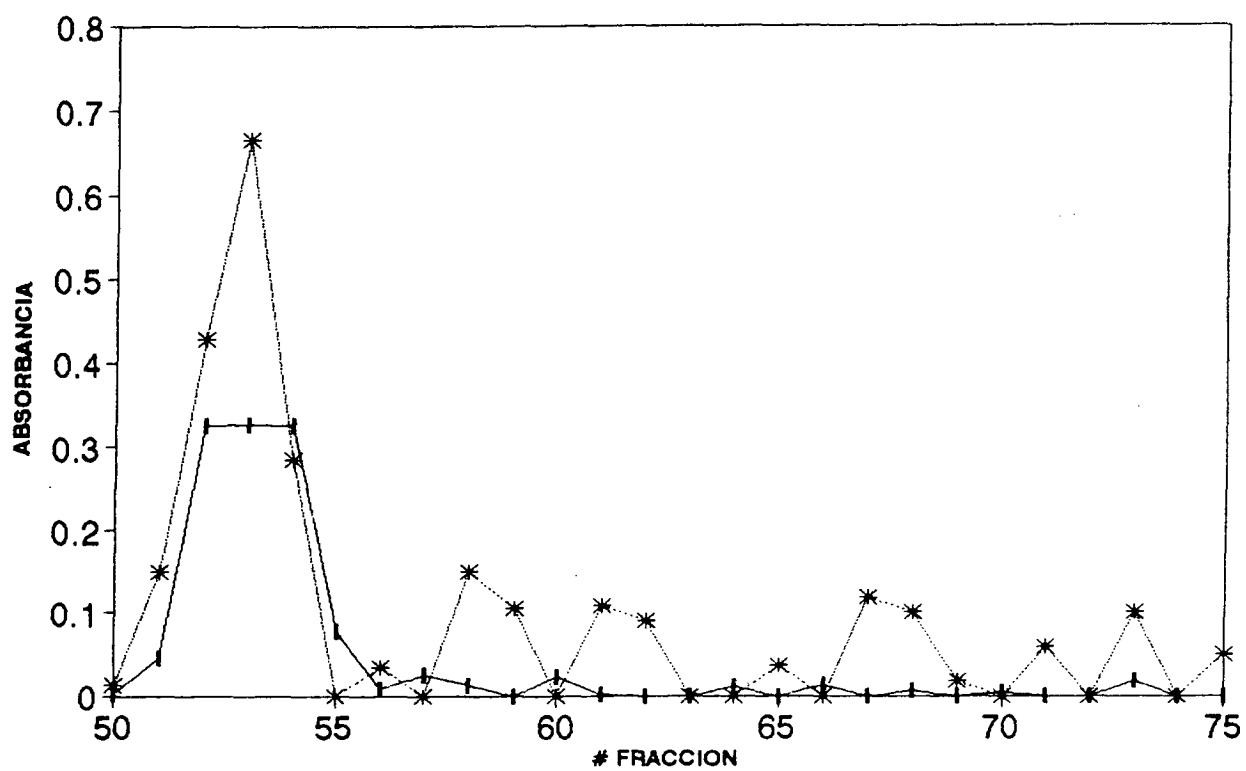
\* no detectada

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



— I CROMATOGRAFIA ..... II CROMATOGRAFIA

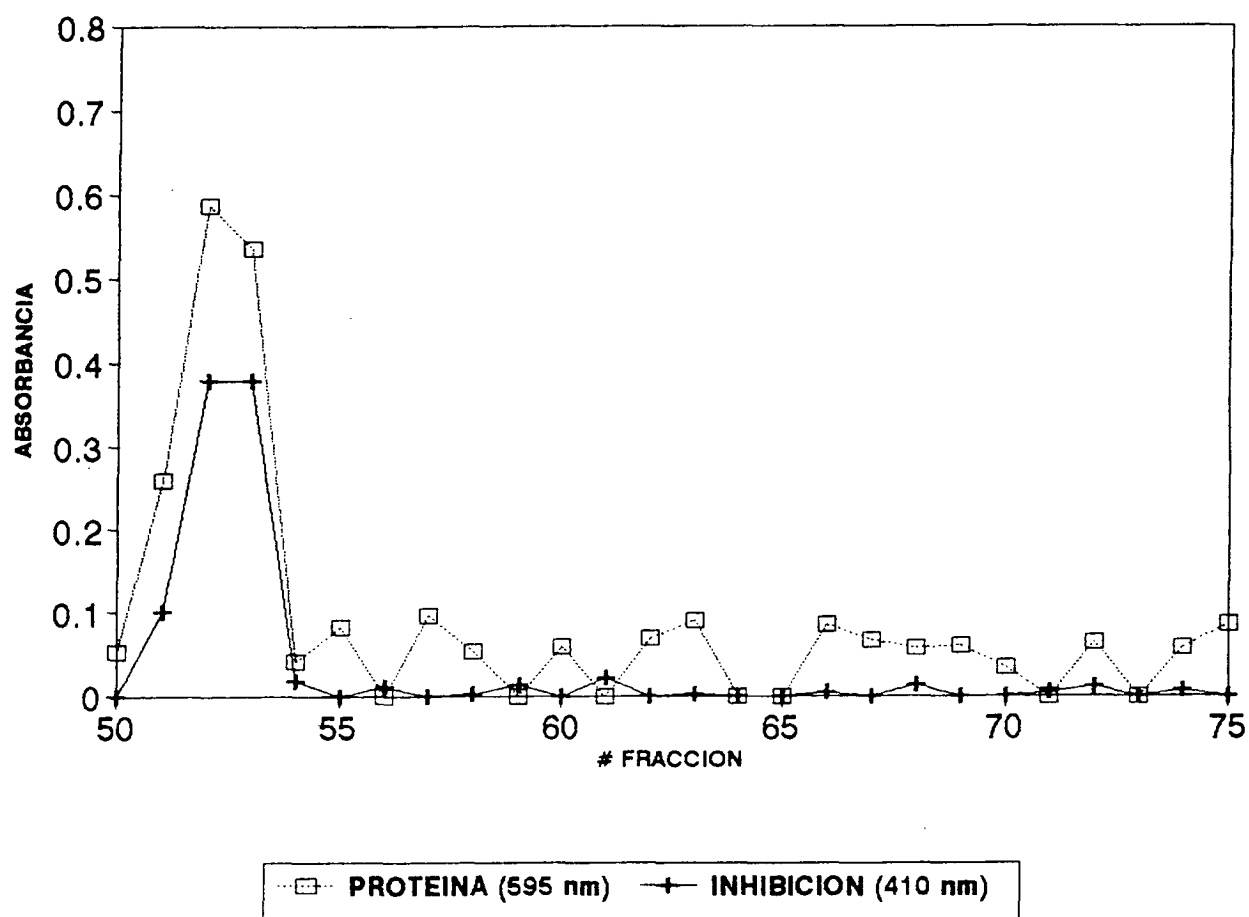
FIG. 2. I CROMATOGRAFIA  
ELUCION CON KCl 0.1 M pH 2



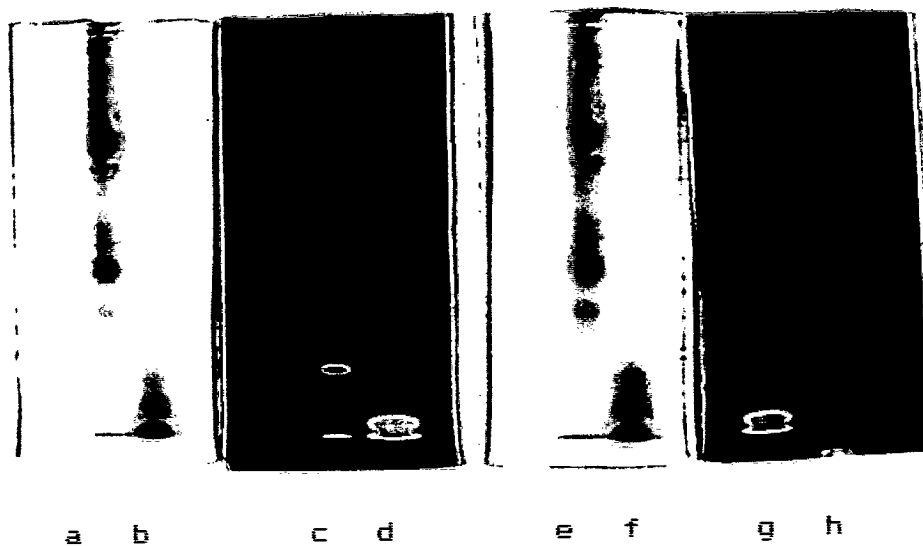
---\*--- PROTEINA (595 nm)    —+— INHIBICION (410 nm)



FIG 3. II CROMATOGRAFIA  
ELUCION CON KCl 0.1 M pH 2

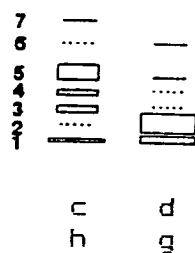


**FIG. 4. ELECTROFORESIS DISCONTINUA DE  
EXTRACTOS Y PRODUCTOS DE CROMATOGRAFIAS**



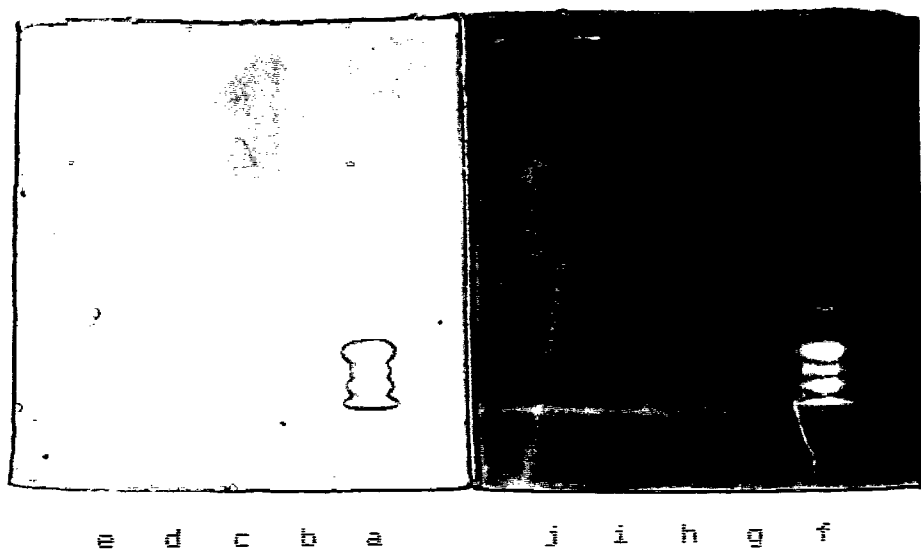
a extracto I, tinción proteína; b producto I, tinción proteína;  
c extracto I, tinción actividad; d producto I, tinción actividad;  
e extracto II, tinción proteína; f producto II, tinción proteína;  
g producto II, tinción actividad; h extracto II, tinción  
actividad.

**Fig. 5. DIAGRAMA DEL PATRON OBTENIDO DE EXTRACTO Y PRODUCTO DE CROMATOGRAFIA**



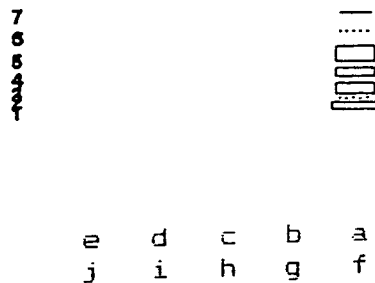
c y h: patrón de extractos, tinción actividad; d y g: patrón de productos, tinción actividad.

**Fig 6. BANDAS DE INHIBICION DE FRIJOLES  
COCIDOS A 0, 30, 60, 90 Y 120 MIN A PA**



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 2, 120 min.


**Fig. 7. PATRON DE INHIBICION DE  
FRIJOLES A 0, 30, 60, 90 Y 120 MIN COC.**

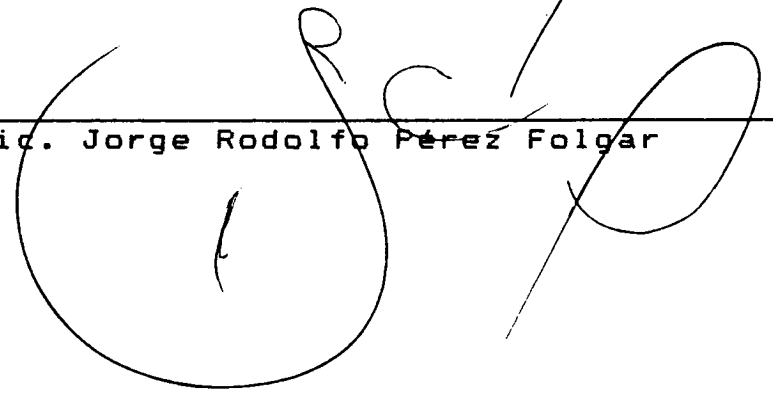


a y f: muestra 1. 0 min; b y g: muestra 1, 30 min; c y h: muestra 1, 60 min; d e i: muestra 1, 90 min; e y j: muestra 1, 120 min.

Estudiante:   
Julieta Eugenia Ortiz Chacón

Asesor:   
Dr. Omar Dary

Directora de Escuela:   
Licda. Diana Pinagel

Decano:   
Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar