

EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO DE PROTEINAS DE LAS SEMILLAS DE MUCUNA PRURIENS

Prakash G. Kadkade¹

Fabiola de Micheo¹

Carlos Luján¹

Las proteínas provenientes de las semillas de *Mucuna pruriens*, al igual que las de otras semillas, son difíciles de solubilizar totalmente. Sin embargo, la solubilidad relativa en ciertos solventes, se ha utilizado para su clasificación.

Se ha logrado un progreso considerable en el conocimiento químico de las proteínas; particularmente en lo relacionado a cómo obtener un mayor fraccionamiento de las mismas, los aminoácidos que las componen, o en lo relacionado al papel que desempeñan los grupos sulfídricos en su estructura y en muchos otros aspectos.

De particular interés se considera el fraccionamiento de las proteínas mediante la filtración en gel de Sephadex.

Las técnicas de fraccionamiento en Sephadex son interesantes porque se acompañan por una mejor alteración individual de las proteínas estudiadas y porque el fraccionamiento depende de la forma y tamaño de sus moléculas. En el presente trabajo se ensayó cierto número de procedimientos diversos de extracción, algunos de los cuales tuvieron éxito en otras semillas, luego se estudiaron los extractos mediante fraccionamiento en Sephadex y electroforesis de disco en gel de poliacrilamida.

Las semillas de *Mucuna pruriens* se colectaron en los departamentos de Santa Rosa, Jutiapa y Chiquimula, en la República de Guatemala, Centroamérica.

Las semillas fueron sometidas a extracciones sucesivas, utilizando agua destilada, solución de cloruro de sodio 0,2M, etanol al 70 por ciento y ácido acético 0,05N. Sucesivamente se centrifugó el extracto y se suspendió el precipitado en el medio de extracción siguiente, dejándolo estar a baja temperatura por varias horas.

En otro experimento, las proteínas se extrajeron utilizando solución tampón de pirofosfato de sodio 0,01M a pH7,0 y luego hidróxido de sodio 0,1N. Las

proteínas así solubilizadas fueron caracterizadas de acuerdo a su precipitación relativa con ácido tricloro acético, al 20 por ciento. Asimismo se llevó a cabo por separado una extracción con una urea 8M, conteniendo 0,1M de lauril sulfato de sodio. Después de la extracción, las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry.

La filtración en gel se llevó a cabo usando Sephadex G-100 y la serie de solventes enumerados en el Cuadro 1.

Para la elución se usó el mismo solvente, excepto que para las fracciones de los extractos en etanol, 70 por ciento y ácido acético 0,05N, se utilizó solución acuosa de cloruro de sodio 1M.

Las columnas se equilibraron primero con el eluyente. Los extractos se concentraron por ultrafiltración en frío y luego sometidos a cromatografía en columna de Sephadex.

Las densidades ópticas de los eluidos se midieron a 280 m μ .

La electroforesis se realizó de acuerdo a la técnica del Dr. Ornstein, en un aparato para electroforesis de Disco "CANALCO" Modelo 12, usando gel de acrilamida, 7 por ciento. El gel al 7 por ciento se preparó de acuerdo a lo especificado en el Boletín de la CANALCO.

Las soluciones se degasificaron y fueron puestas en tubos de pyrex (vidrio refractorio) de 6 mm x 6 cm y se dejó que se efectuara la polimerización del ambiente. El gel se insertó a pH8,9 y se corrió a pH9,5. Se utilizó una corriente de 4 ma por disco proveída por generador de la Buchler Instruments. La electroforesis se detuvo cuando el frente formado por el colorante trazador Azul de bromofenol (0,005 por ciento) emigró una distancia de 5,5 cm en unos 40 minutos.

¹ Técnicos del Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial, (ICAITI).

Cuadro 1. Extracción por solvente "Clásico" (porcentaje de la composición de proteínas)

Solvente	Proteína	Partes de la planta (% de proteínas)			
		Tallo	Hojas	Pericarpio del fruto	Semillas
Agua	Albumina	18	15	24	48
NaCl 0.2 M	Globulina	7	10	17	27
Etanol 70 %	Prolamina	15	10	9	3
Acido Acetico 0.05 N	Glutelina	2	4	4	4

Los geles se removieron de los tubos de vidrio y se colorearon por una hora en una solución de amilina negra al 5 por ciento, disuelta en ácido acético al 7 por ciento. El exceso de colorante se removió electroforéticamente.

El Cuadro 1 muestra los resultados de las extracciones, tanto individuales o separadas y las sucesivas basadas en los solventes clásicos de Osborne.

El contenido de albúminas en las diferentes partes del vegetal varió de un 15 — 45 por ciento. El porcentaje más elevado de albúmina se encontró en las semillas, y el más bajo, en las hojas. Las globulinas variaron de un 7 — 27 por ciento y nuevamente aquí su porcentaje fue mayor en las semillas.

Las prolaminas o extracto alcohólico estuvieron en mayor contenido en el tallo y las hojas, mientras que el más bajo se encontró en las semillas.

Las glutelinas solubles en ácidos dieron un contenido porcentual relativamente bajo y no hubo una diferencia apreciable entre las diferentes partes de la planta de *Mucuna pruriens*. La extracción con pirofosfato de sodio 0,01M dio relativamente un porcentaje alto de proteínas totales, pero ésta no es completa. Un 56 por ciento de las proteínas fueron precipitables en ácido tricloroacético y se mantuvieron solubles en hidróxido de sodio 0,1N. Los resultados de todo esto se presentan en el Cuadro 2. También muestra los resultados en la extracción de semillas con urea 8M, conteniendo 1 por ciento de lauril sulfato de sodio. Mediante este procedimiento se solubilizó y extrajo la mayor cantidad de proteína.

Aparentemente una concentración más baja de detergente aniónico aumenta la extracción completa. El Cuadro 3 muestra los resultados obtenidos en el fraccionamiento de las proteínas de las semillas por filtración en gel.

El extracto acuoso mostró los tres máximos debidos a las albúminas. Uno en 130 ml, cuyo peso molecular se determinó en el rango de 60 — 70.000 (Figura 1). El segundo en 230 ml con un peso molecular aproximado de 13.000 y el último a los 420 ml, con un peso molecular en el rango de 2 a 3.000. Lo último se ve que es debido a que ambas moléculas son de mucho más bajo peso molecular, las cuales son extraídas con agua destilada o tal vez alguna fracción de albúminas degradadas.

La Figura 2 muestra el fraccionamiento de globulinas. Al igual que en las albúminas, se obtuvieron tres picos principales. El pico a los 140 ml representó la fracción principal, con peso molecular aproximado, oscilando en el rango de 40 a 50.000, mientras que el otro pico menor a los 250 ml representa un peso molecular de 12.000. En el etanol aparecieron cuatro picos (Figura 3), uno de los cuales en un volumen vacío, presumiblemente perteneciente a una materia con un pico arriba de 100.000 y un pico pequeño pero amplio, a un volumen similar al pico del cloruro de sodio. Con las glutelinas y péptidos se obtuvieron dos picos (Figura 4). El pico mayor se obtuvo a los 140 ml, con un peso molecular aproximado, en el rango de 50 a 60.000 y otro pico menor a los 260 ml, con un peso molecular en el rango de 10 — 11.000. El extracto obtenido en pirofosfato de sodio mostró un pico principal y varios secundarios (Figura 5). El pico mayor fue ligeramente amplio, incluyendo amplio margen de proteínas, con un peso molecular de 40 a

80.000. Se observó un patrón similar en la extracción con urea 8M (Figura 6). El pico mayor eluyó a los 110 ml, con un peso molecular aproximado de 94.000, mientras que otros dos picos mayores con un peso molecular que oscila entre 65.000 y 250.000, respectivamente. Se obtuvieron algunos otros picos menores, y probablemente se debió a disociación de proteínas durante el proceso de extracción. Pesos moleculares aproximados se muestran en el Cuadro 3, los cuales se determinaron por comparación con patrones individuales de las siguientes proteínas: aldolasa, celulosa, fosfatasa ácida, β glucosidasa, α amilasa, pectin metilesterasa, albúmina bovina y citocromo C. Las fracciones obtenidas después de la filtración en gel también fueron corregidas por electroforesis. La Figura 7 muestra algunos de estos resultados.

Se encontró que la movilidad electroforética de estas bandas fue proporcional a sus tamaños moleculares relativos y al patrón de elución de las fracciones.

Parece ser que alguna disociación pudo haber ocurrido en la solución de urea 8M, por el hecho de que ninguna proteína muestra un peso molecular mayor de 95.000 en ese solvente, mientras que las fracciones de prolaminas tienen pesos moleculares superiores a 100.000.

También en la urea se presentaron pesos moleculares de 94.000, 65.000 y 25.000. Esto se debió a su propia disociación. Es algo dudoso tratar de identificar las proteínas extraídas con urea, cuando se comparan los resultados obtenidos al usar solventes clásicos como medios de extracción.

Sin embargo, es posible que la mayor fracción extraída con urea, de peso molecular de 94.000, incluye la fracción prolamina de 87.000.

Esto no proporciona ningún intento de clasificación de proteínas extraídas con urea, como se hará con las extraídas con solventes clásicos.

Cuadro 2. Extracción de proteínas de las semillas de *Mucuna pruriens*, por varios solventes.

SOLVENTE	PROTEINA	% DE PROTEINA TOTAL EXTRAIDA
Agua	Albúmina	48
NaCl 0.2 M	Globulina	27
Etolol 70 %	Prolamina	3
Acido Acetico 0.05 N	Glutelinas	4
Pirofosfato de Sodio 0.01 M con 0.7 % de mercaptoetanol	Soluble	68
NaOH 0.1 M	Soluble	56
Urea 8 M con 0.1 % de lauril sulfato sódico	Soluble	92

Cuadro 3. Fraccionamiento de proteínas de las semillas de mucuna pruriens por "filtración en gel"

Solvente	Volumen vacío (ml)	Fracción	Filtración en Gel de Sephadex G-100		
			Componente No.	Volumen de Elución	P.M. Rango (x 10 ³)
AGUA	78	ALBUMINA	1	130	64
			2	230	13
			3	420	3
NaCl 0.2 M	95	GLOBULINA	1	140	52
			2	250	12
			3	280	9
ETANOL 70 %	95	PROLAMINAS	1	40	100
			2	110	94
			3	250	12
			4	390	2
ACIDO ACETICO 0.05 N	95	GLUTELINAS	1	140	52
			2	260	11
TAMPON PIROFOSFATO DE SODIO 0.01 M	80	SOLUBLE	1	130	40-80
			2	—	—
UREA 8M CON 0.1 % DE LAURIL SULFATO SODICO	78	SOLUBLE	1	110	94
			2	150	46
			3	210	25

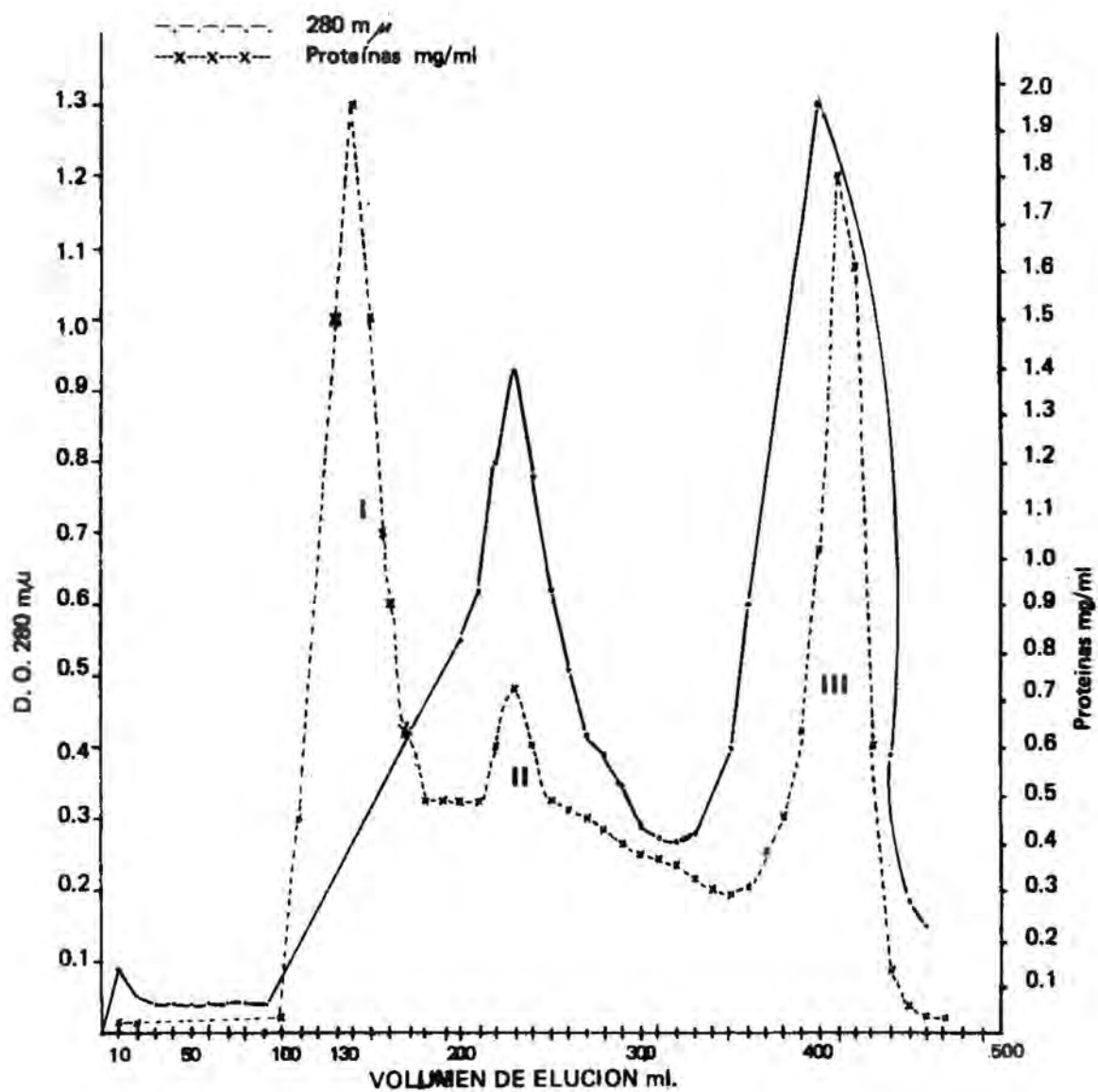


Figura 1: Curva de elución de proteínas de semilla de *Mucuna pruriens* extraídas con agua (Albúminas) en Sephadex G-100

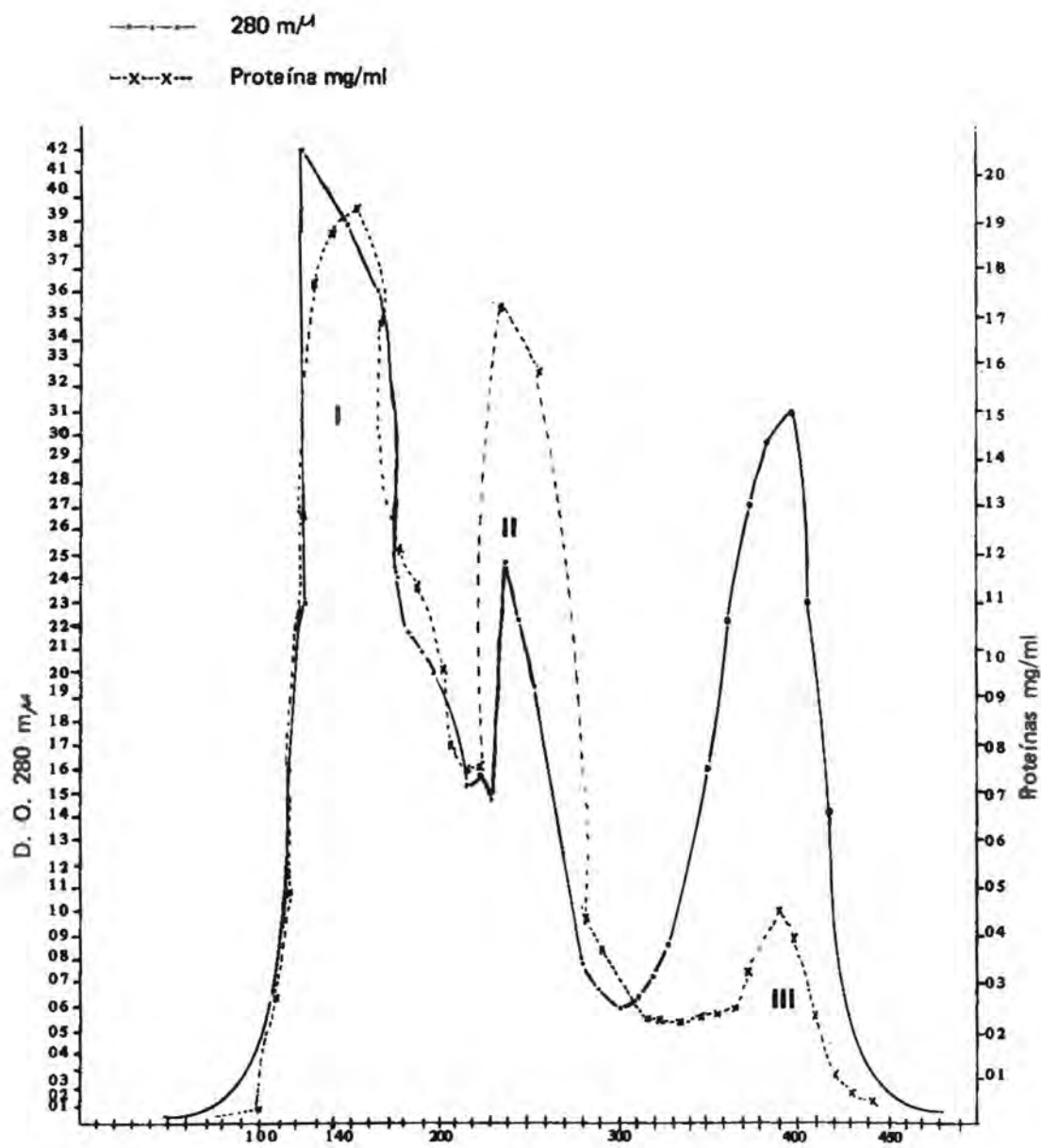


Figura 2. Curva de elución de proteínas de semilla de *Mucuna Pruriens* extraídas con NaCL 0.2 M (Globulinas) sobre Sephadex G - 100.

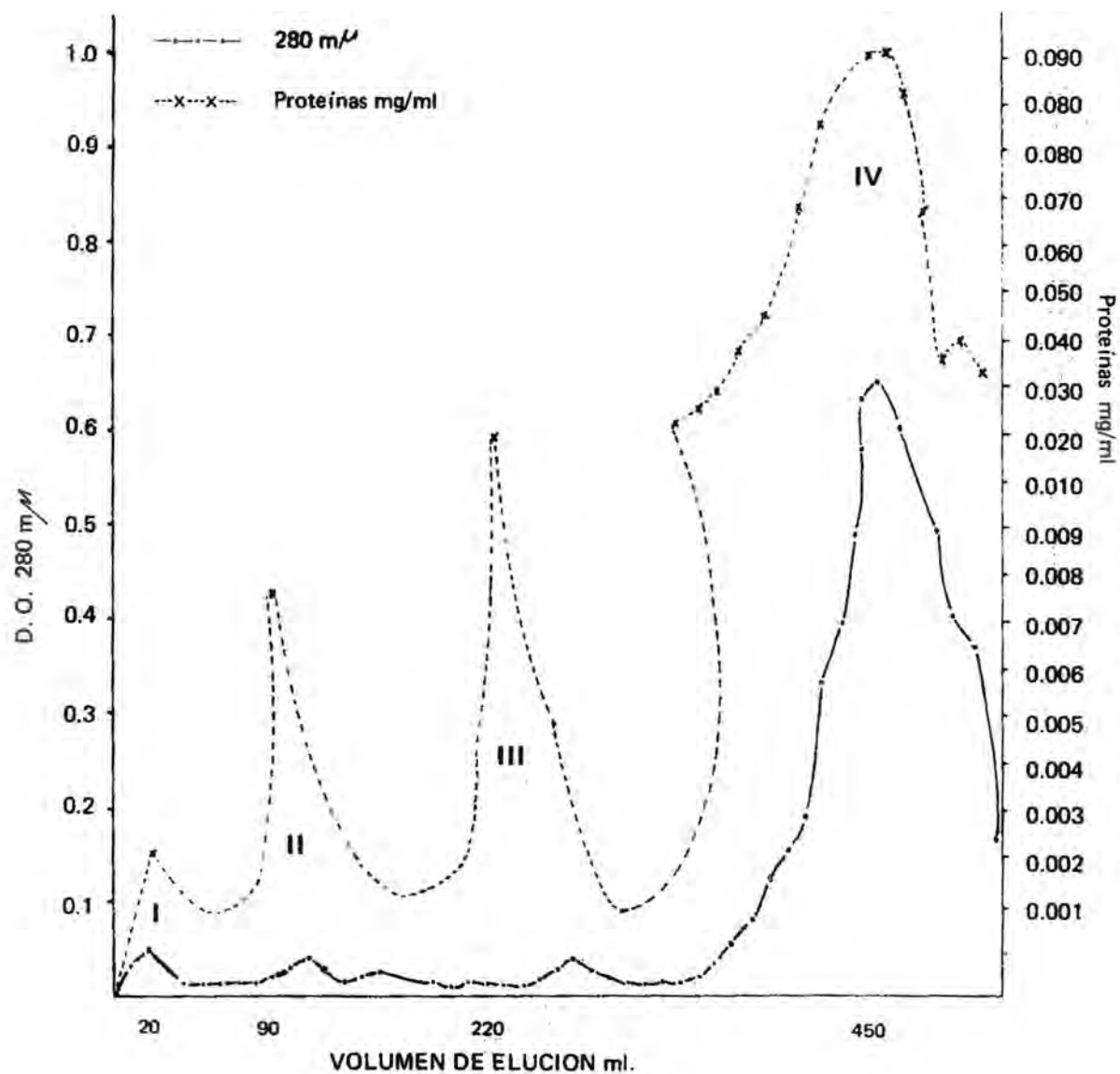


Figura 3 Curva de elución de proteínas de semilla de *Mucuna pruriens* extraídas con etanol 70 % (Prolaminas) sobre Sephadex G — 100

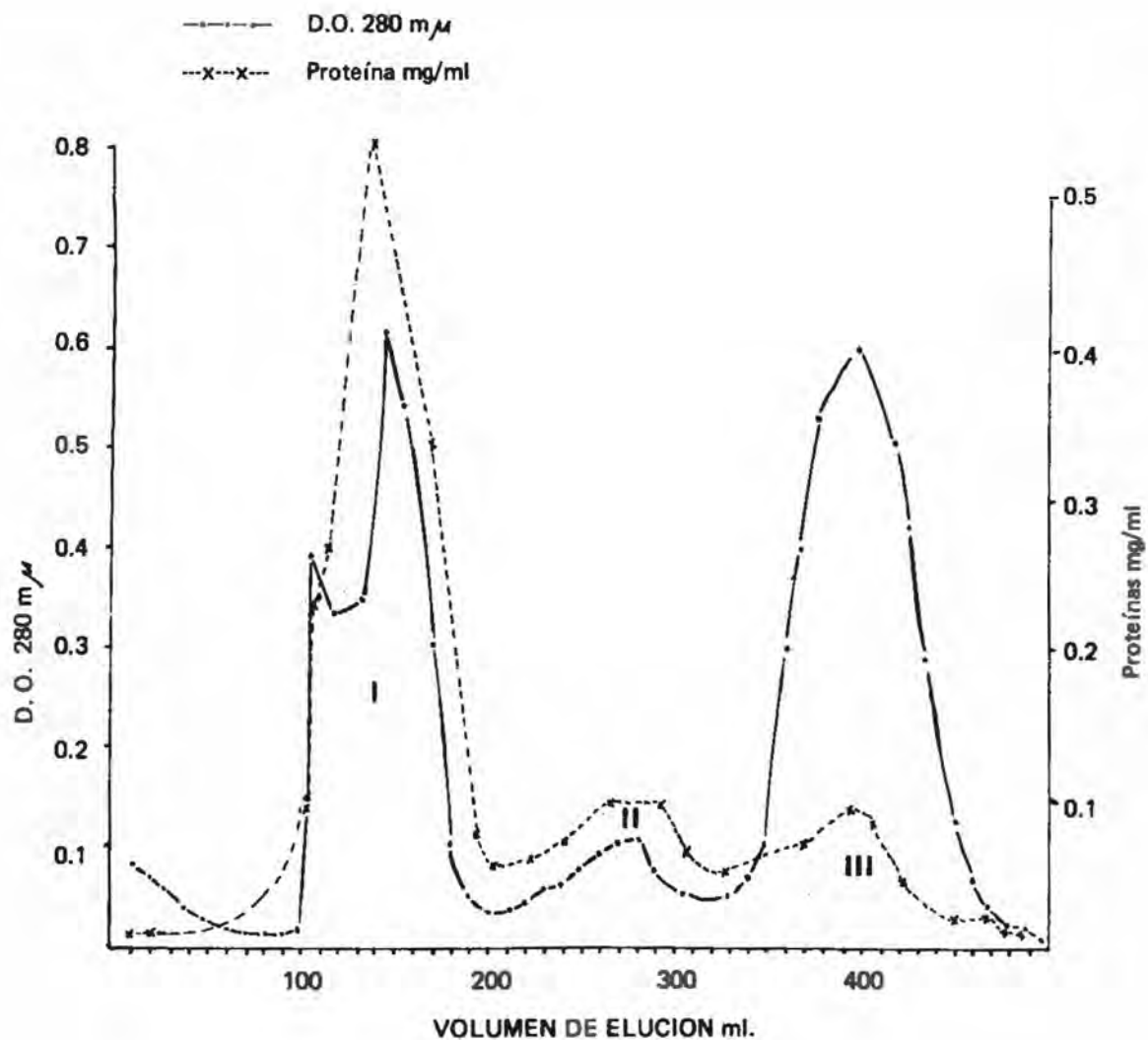


Figura 4. Curva de elución de las proteínas de semilla (*pruriens*) extraídas con ácido acético en 0.05 N (Glutelinas) sobre Sephadex G-100.

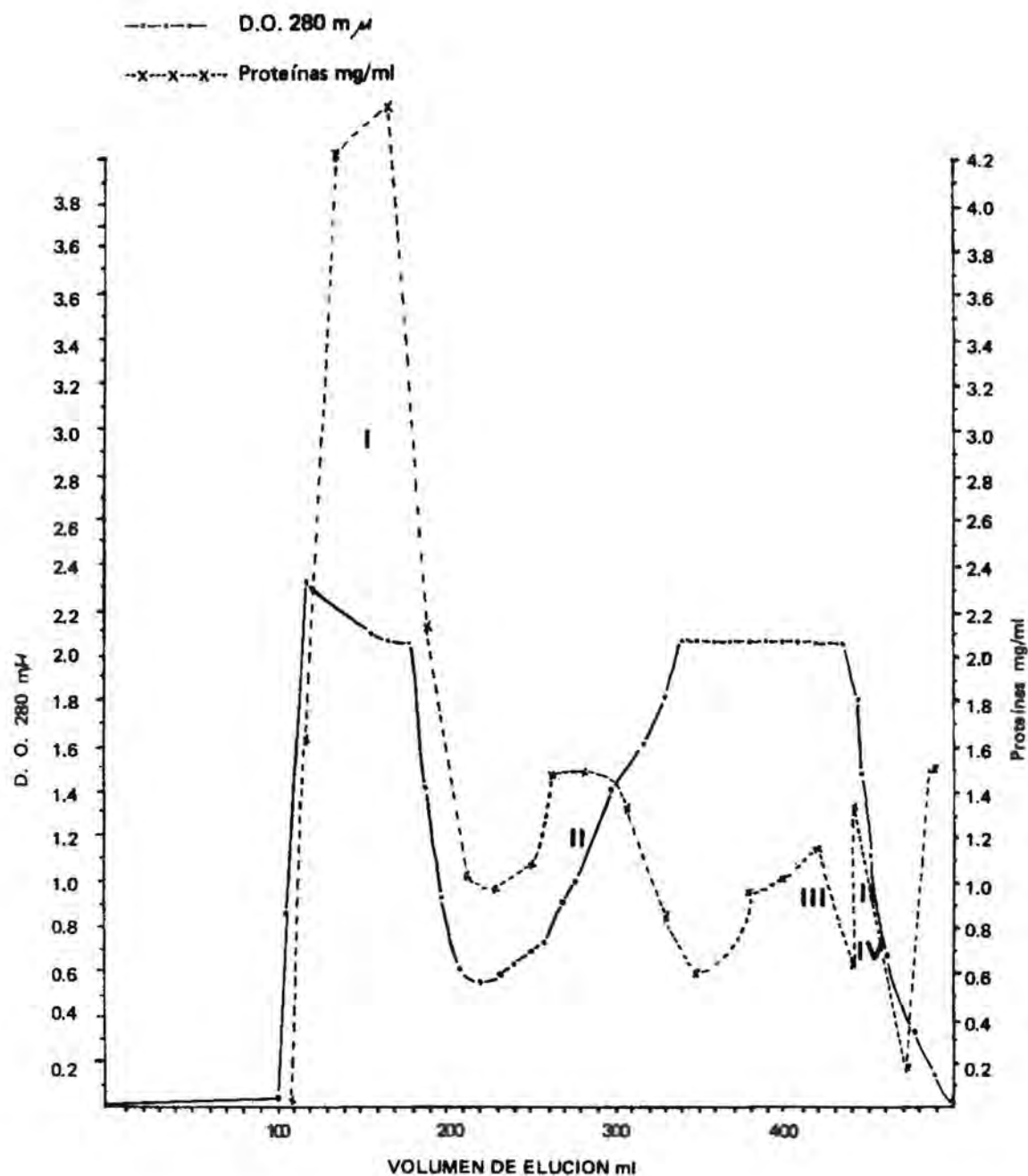


Figura 5. Curva de elución de proteínas de semilla de *Mucuna pruriens* en Buffer de Pirofosfato sódico 0.01 M con 0.7 por ciento de mercaptoetanol (soluble) sobre Sephadex G-100

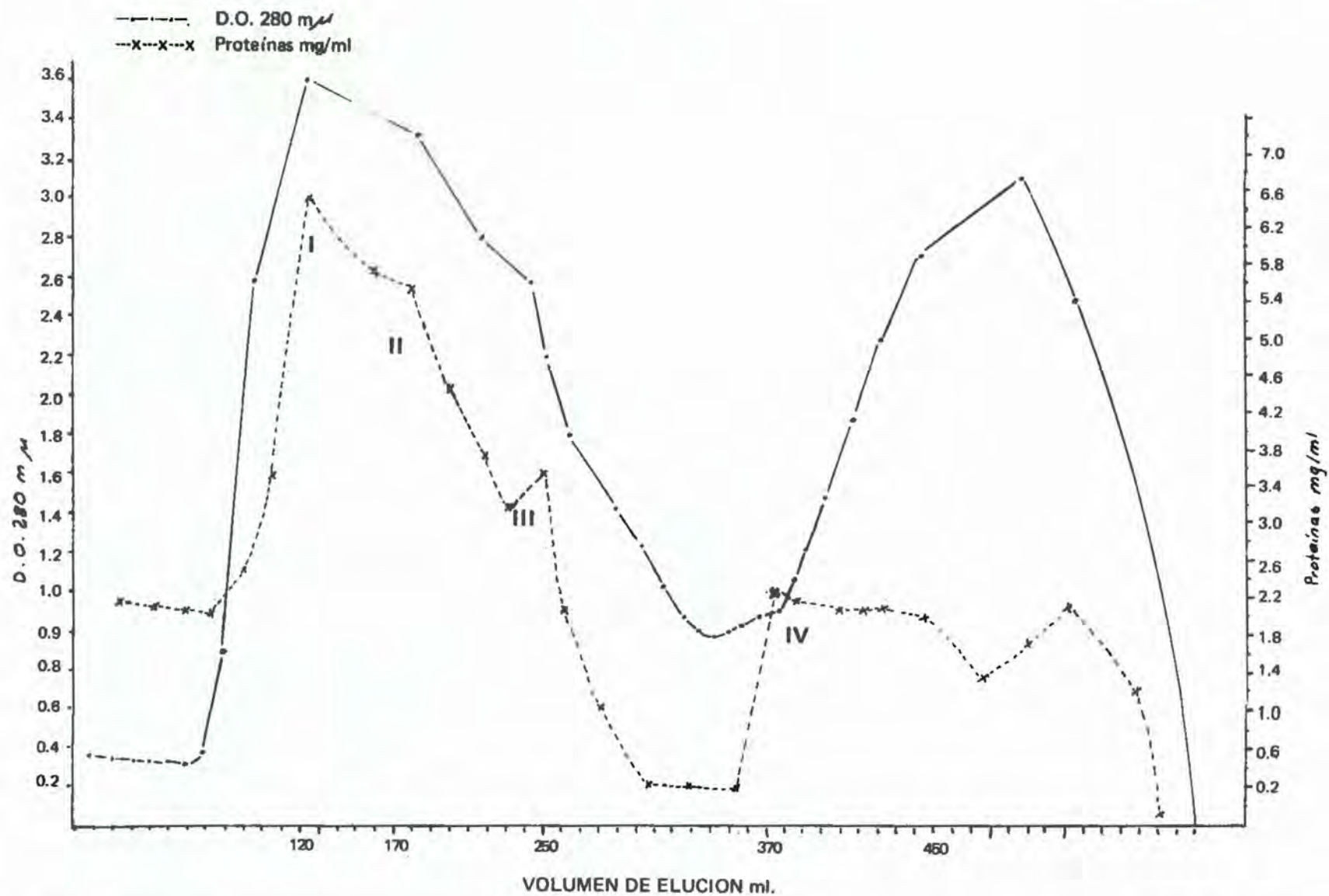


Figura 6. Curva de elución de proteínas de semilla de *Mucuna pruriens* extraída con Urea 8 M conteniendo 0.1 por ciento de Lauril Sulfato de Na sobre Sephadex G-100.

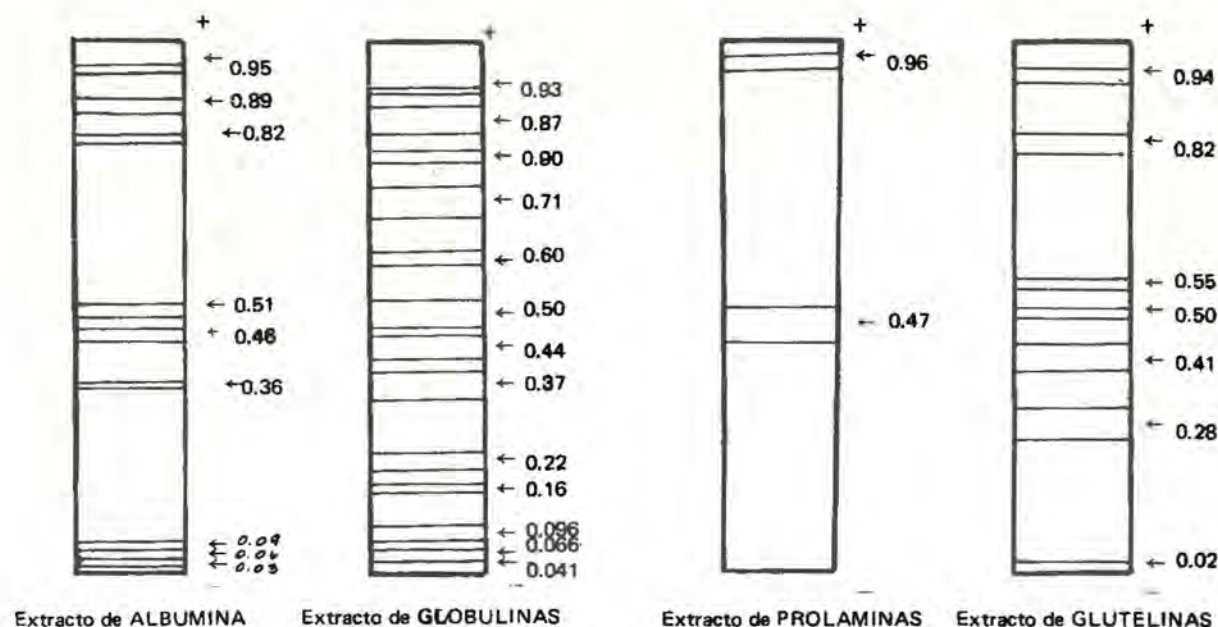


Figura 7: Electroforesis en gel de disco con Poliacrilamida de Albúmina, Globulina, Prolaminas y Glutelinas de semillas.

PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LAS PRINCIPALES ALBUMINAS AISLADAS DE LAS SEMILLAS DE *MUCUNA PRURIENS*

Prakash G. Kadkade¹
 Fabiola P. de Michao¹
 Rosa María Martínez¹
 Julio E. Andrade¹

Han sido separadas las proteínas solubles de las semillas de *Mucuna pruriens* usando técnicas de filtración en gel y electroforesis. Sin embargo, la heterogeneidad de los extractos protéicos, aun después de un fraccionamiento preliminar, ha limitado la evaluación de estos resultados.

Mientras tanto, se hicieron intentos para extraer y purificar los extractos protéicos solubles en agua, por aplicación de la cromatografía de intercambio iónico, usando dietilaminoetil celulosa (DEAE Celulose), en combinación con la técnica de filtración en gel, usando Sephadex G-100. Se esperaba que tal estudio revelaría la naturaleza de las principales albúminas, las cuales representan la fracción principal de las proteínas totales. Se hizo también un intento para seguir las etapas de purificación con estudios electroforé-

ticos y determinar algunas de las características físicas y químicas de la principal fracción de albúmina.

Las semillas de *Mucuna pruriens* colectadas en los Departamentos de Santa Rosa, Jutiapa y Chiquimula, de la República de Guatemala, C. A., fueron homogenizadas en agua destilada fría. El homogenizado fue dejado en reposo toda la noche, a 4°C, y luego centrifugado a 2.000 x g. El sobrenadante así obtenido fue concentrado por ultrafiltración, pasándolo a través de una membrana uM-2 a 4°C.

El extracto concentrado se aplicó en una columna de DEAE Celulosa, previamente lavada y eluida con

¹ Técnicos del Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial, (ICAITI).