

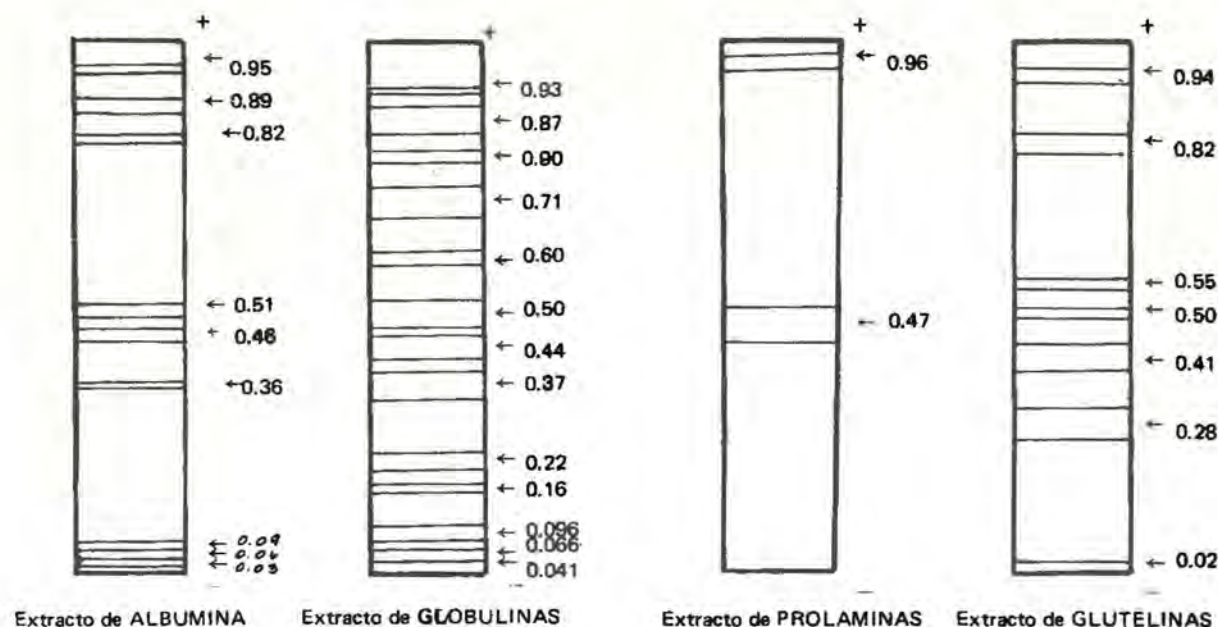


Figura 7: Electroforesis en gel de disco con Poliacrilamida de Albúmina, Globulina, Prolaminas y Glutelinas de semillas.

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).

tampón de pirofosfato 0,01M de pH 7,0 con un gradiente lineal de 25 μ M — 300 μ M de cloruro de sodio. El eluido fue colectado en fracciones de 10 ml, y su absorbencia leída a 280 m μ . Una parte del eluyente se usó para determinación de proteína por el método de Lowry *et al.* La mayor fracción, basada en la concentración de la proteína fue recolectada, concentrada por ultrafiltración y cromatografiada en Sephadex 100. El agua destilada se usó para eluir las proteínas durante el proceso de filtración en gel. Las fracciones obtenidas por DEAE Celulosa en columna y por técnicas de filtración en gel se usaron para su estudio por electroforesis.

La electroforesis se practicó en un aparato vertical obtenido de CANALCO INDUSTRIAL CORP., de acuerdo a los métodos de ORNSTEIN Y DAVIS. La concentración de acrilamida fue de 7,5 por ciento y se aplicó un potencial de 5 mA, por tubo durante 45 minutos. El revelado de color se hizo con añilina azul-negro y el exceso de ésta se hizo electroforéticamente.

La concentración de proteínas en el gel se determinó densitométricamente. El punto isoelectrico de la fracción de albúmina purificada se determinó por reacción de la proteína en la respectiva fracción con DEAE Celulosa y CM Sephadex.

Los experimentos preliminares en el fraccionamiento de proteínas de semillas, solubles en agua por cromatografía en DEAE Celulosa (Fig. 1) demostraron que la mayor cantidad de componentes solubles en agua, es eluida con tampón pirofosfato con un gradiente lineal de 25 μ M de NaCl.

Un análisis de esta fracción concentrada, por electroforesis de disco en gel de poliacrilamida, (Fig. 3B) muestra la presencia de dos bandas anódicas a pH 9,5, también hay dos bandas catódicas de movilidad lenta, componentes de esta fracción.

La concentración de componentes catódicos fue de 3—4 veces aproximadamente, la de los componentes asociados con el ánodo (Fig. 4). La Figura 3B ofrece un panorama del proceso de fraccionamientos con DEAE Celulosa en base al número de bandas aparecidas en comparación con la Figura 3A; el número total de bandas aparecidas en el extracto acuoso de semillas (concentrado) es de 9 (Figura 3A), de las cuales tres en el centro, mientras que las otras seis se dividieron: tres al ánodo y tres al cátodo.

Las investigaciones preliminares indican que la filtración en gel de Sephadex G—100 no efectuó una separación clara de albúminas presentes en el extracto acuoso. Parece sin embargo, que tal separación es posible por el uso de una materia prima menos com-

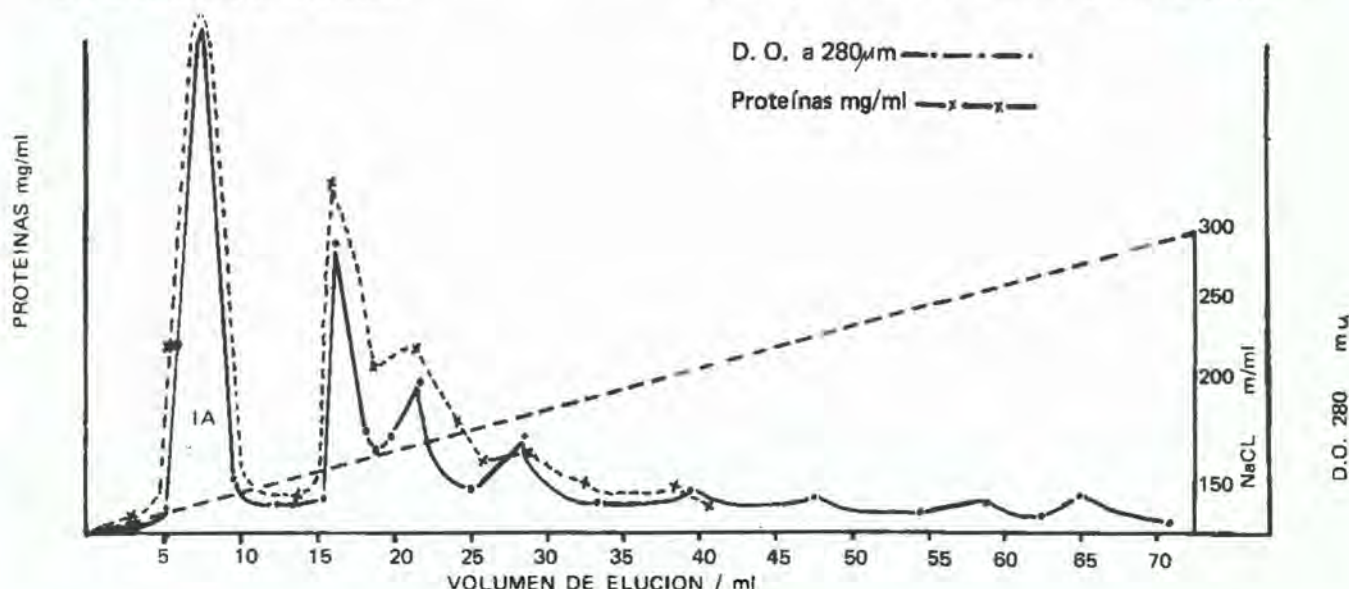


Figura 1. Cromatografía preparativa en Deae-celulosa del extracto acuoso de semillas de *Mucuna pruriens*. El extracto acuoso fue concentrado a 5 ml por ultrafiltración. El concentrado fue colocado en la columna de Deae-celulosa (78 x 2.4 cm) y eluido con buffer fosfato 0.01 M pH 7.0 y con un gradiente lineal de NaCl de 25-300 μ M/ml preparado en el mismo buffer. Se colectaron fracciones de 10 ml, se leyó D.O. a 280 μ m y se determinó contenido de proteína en cada una por el método de Lowry *et al.*

pleja; por lo tanto, la fracción pasada por DEAE Celulosa, que contiene la mayor cantidad de albúmina, se sometió a filtración en gel de Sephadex G-100. El perfil de elución para un experimento típico de esta naturaleza se muestra en la Figura 2. Las proteínas del primer máximo se eluyeron muy cerca del volumen vacío, pero debido a su muy pequeño tamaño, este máximo puede considerarse como insignificante. El segundo máximo contiene las albúminas, las cuales parecen ser cercamente homogéneas electroforéticamente (Figura 3C y D).

Un ensayo de proteínas por el método de Lowry, en la fracción de la columna de Sephadex G-100 indicó que dos tercios de la proteína total que se usó para fraccionamiento pertenecen al segundo máximo. Las movilidades electroforéticas (Cuadro 1) de las dos bandas aparecidas muy cercanas podrán representar una sola proteína. Por comparación con la proteína patrón en filtración en gel, se deduce que es la de más bajo peso molecular, aproximadamente, en el rango de 11-12,000. El punto isoeléctrico (Cuadro 1) está también muy cercano más o menos 5.2 - 5.4.

La composición en aminoácidos de las albúminas purificadas (Cuadro 2) son similares a las albúminas

de las semillas totales; son deficientes en metionina y triptófano, pero contienen el más alto porcentaje de lisina. Las albúminas de vicia faba, frijol de soya y otras leguminosas relacionadas, tales como cassia sianea y albizia lebbek, son nutricionalmente completas.

Las características físicas y químicas de las dos proteínas no dejan ningún intento para que puedan purificarse posteriormente, debido a su dificultad. Las similitudes pueden deberse a que las albúminas tengan funciones específicas y comunes, hasta ahora desconocidas.

El hecho de que dos albúminas son eluidas en un sólo máximo de la columna Sephadex G-100, coincide con la escasa variación de su peso molecular. La diferencia en movilidad electroforética podría ser adscrita a la escasa diferencia en la composición de sus aminoácidos.

Finalmente, los estudios relacionados con la ultra centrifugación y electroforesis en gel de poliacrilamida podrán darnos una información más precisa acerca de la naturaleza de estas proteínas mayores.

Podrá ser también interesante, determinar su papel biológico y funcional en el desarrollo de la semilla.

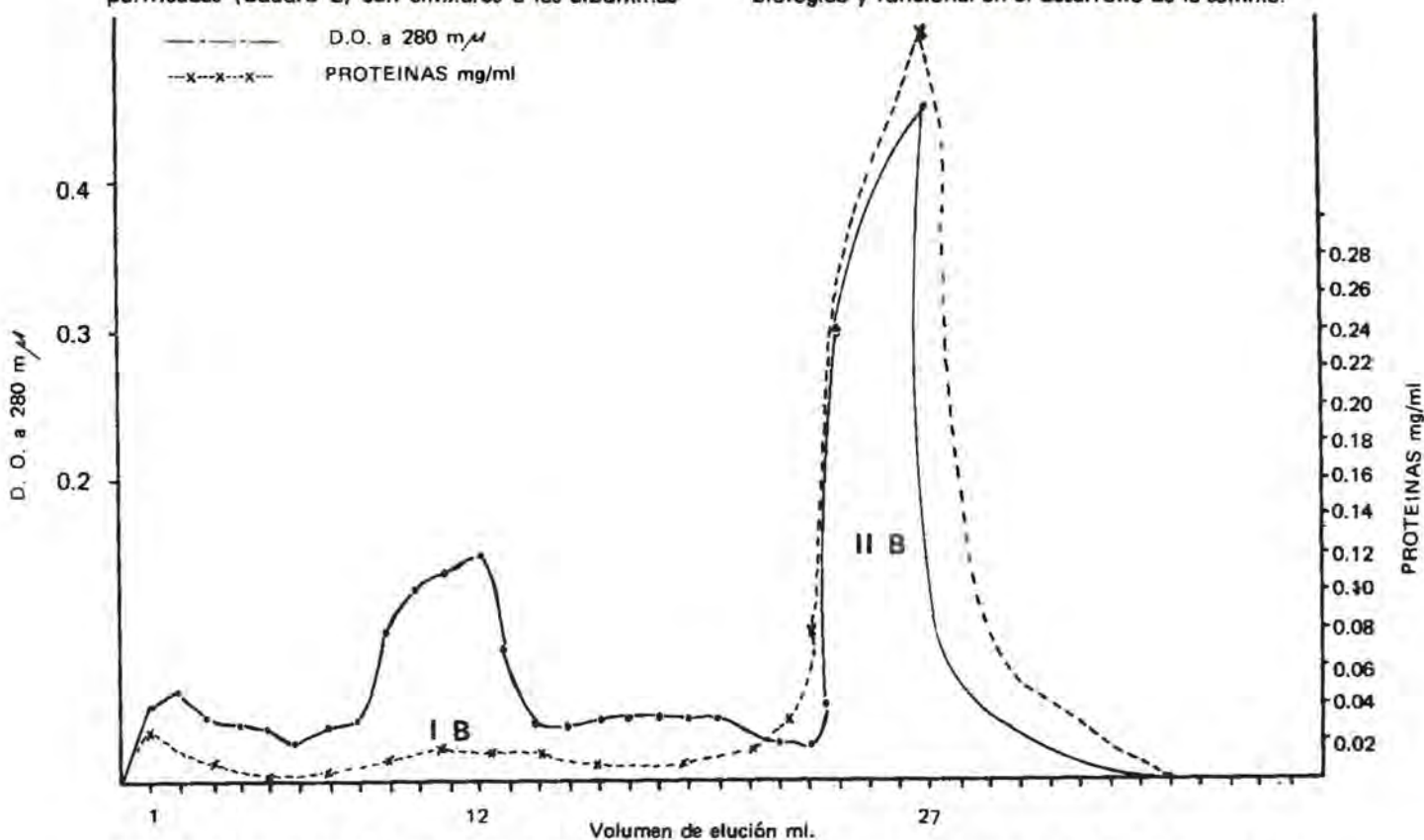
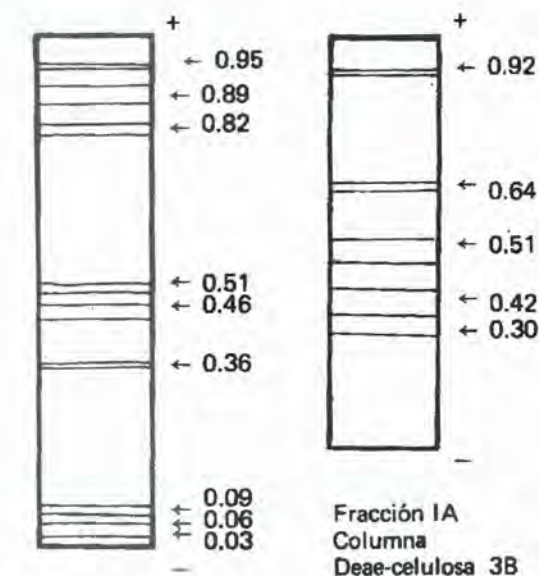


Figura 2. Fraccionamiento de las albúminas de la semilla de *Mucuna Pruriens* por filtración en gel con Sephadex G-100. La fracción I-A de la columna deae-celulosa (tubos del 5-12) fueron combinadas concentradas por ultrafiltración y cromatografiadas en columna de sephadex G-100 (78 x 2.4 cm).



Extracto de Albumina 3A

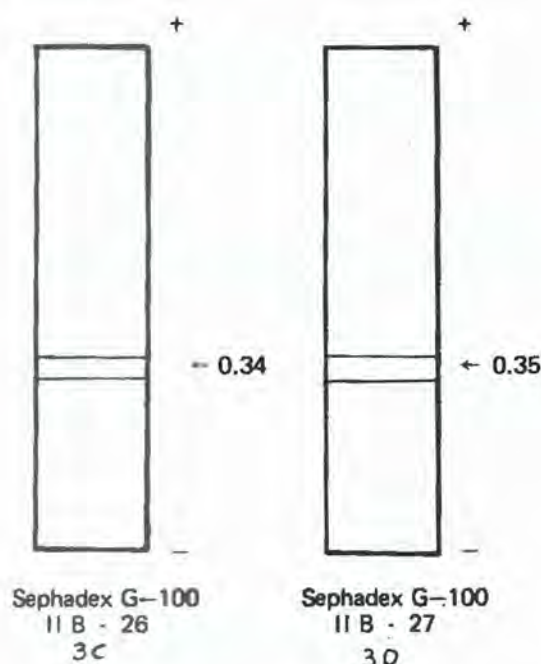


Figura 3. Modelo de la electroforésis de albuminas de los extractos de semilla; deae-celulosa fracción IA y fracciones IIB de sephadex G-100.

La migración en el gel de poliácridamida se llevó a cabo con un sistema de buffer de tris-glicina pH 9.5. La concentración de acrilamida fue de 7.5 por ciento (P/V).

Cuadro 1. Puntos isoelectricos y pesos moleculares de Mb 0.34 y 0.35[†]

Movilidad electroforética	Punto isoelectrico	Peso molecular
0.34	0.54	12,000
0.35	0.52	11,000

* La movilidad electroforética del azul de bromofenol en el sistema se asumió de 1.

Cuadro 2. Análisis de amino ácidos en hidrolizados combinados de albuminas[†] Mb 0.34 y 0.35

Amino ácido	Albuminas 0.34 y 0.35	Huevos	Frijoles
Acido aspártico	2.1		
Lisina	8	7.2	4.0
Treonina	6.2	4.3	2.2
Triptófano		1.5	0.8
Serina	5.0		
Histidina	3.8	2.1	1.7
Acido glutámico	1.9		
Prolina	1.7		
Glicina	7.3		
Alanina	8.5		
Cistina	5.2		
Metionina	2.5	4.1	1.4
Isoleucina	9.8	8.0	4.0
Valina	5.6	7.3	4.0
Tirosina	6	4.5	4.4
Fenil Alanina	6.4	6.3	5.1
Arginina	7.8	6.4	9.4
Leucina	7.4	4.2	6.4

* Amino ácidos expresados en porcentaje calculados del total de amino ácidos recuperados.

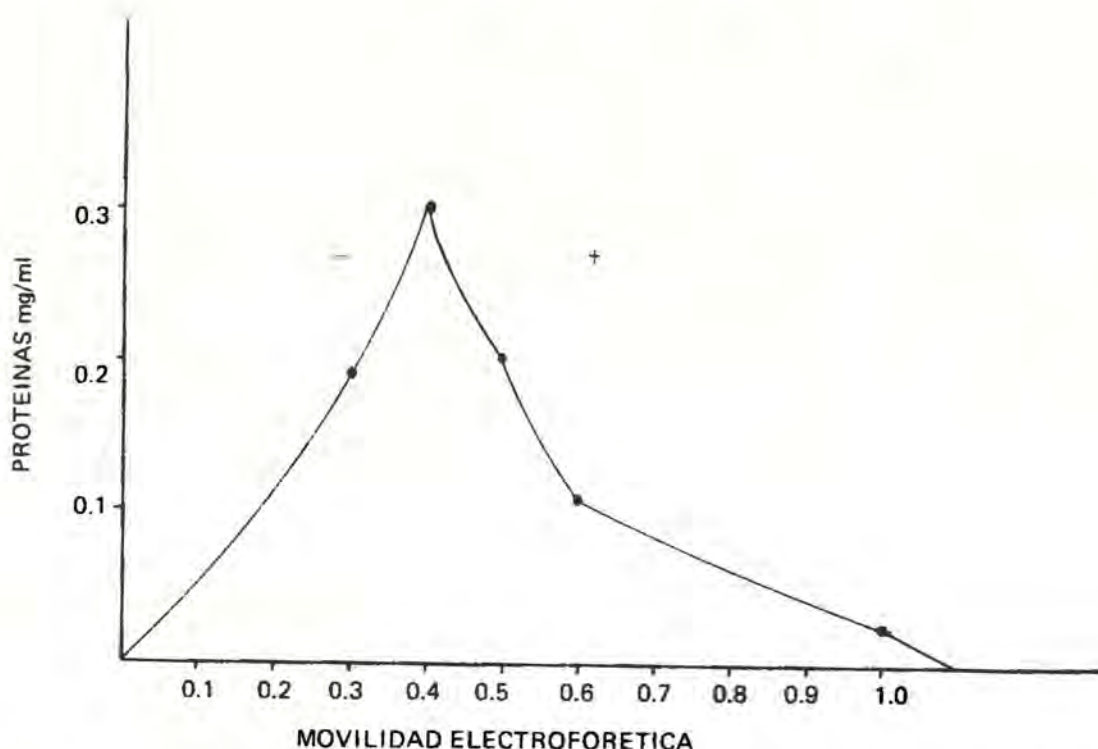


Figura 4. Recorrido densitométrico en gel de Disco con compuestos proteínicos de la fracción DEAE Celulosa 1A y su relación con la movilidad electroforética y tamaño molecular.

ESTUDIO EN SEMILLAS Y PERICARPIO DE *MUCUNA PRURIENS* DE LAS PROTEÍNAS SOLUBLES EN VARIOS DISOLVENTES, APLICANDO ELECTROFORESIS DE DISCO EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Prakash G. Kadhade¹
 Fabiola de Micheo¹
 Rosa María Martínez¹
 Tirso Madrid¹
 Julio E. Andrade¹
 José Antonio Recinos¹

En el laboratorio se extrajeron y fraccionaron las proteínas de las semillas y los pericarpios de los frutos de *Mucuna pruriens*, mediante la filtración en gel en Sephadex G-100. (El Sephadex se basa en la porosidad).

Se encontró, sin embargo, que es difícil obtener una información precisa concerniente al número de componentes de la proteína y su concentración. A menudo algunas proteínas son eluidas en el mismo pico durante la filtración en gel, lo cual provoca interpretaciones erróneas de los datos que se obtie-

nen, a menos que esta técnica se acompañe de otros estudios tales como la electroforesis.

En el presente trabajo se desea presentar los datos obtenidos, concernientes a la composición de todas las fracciones obtenidas de las semillas, mediante extracciones sucesivas con: agua, solución acuosa de cloruro de sodio 0,2M, tamponada a un pH 7, etanol al 70 por ciento, ácido acético 0,05N; así también las

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