

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE LOS INHIBIDORES
DE TRIPSINA PRESENTES EN SEMILLAS DE LEGUMINOSAS O
GRAMÍNEAS PRODUCIDAS EN EL ECUADOR

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGROINDUSTRIAL

FERNANDA ELIZABETH MUÑOZ ALVAREZ

fermfm227agr@hotmail.com

Director: ING. JUAN PATRICIO CASTILLO DOMÍNGUEZ, Ph. D.

pesd@yahoo.com

Quito, Septiembre 2 011

©Escuela Politécnica Nacional 2011
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Fernanda Elizabeth Muñoz Alvarez, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Fernanda Elizabeth Muñoz Alvarez

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Fernanda Elizabeth Muñoz Alvarez, bajo mi supervisión.

Ing. Patricio Castillo, Ph.D.
DIRECTOR DE PROYECTO

AUSPICIO

La presente investigación contó con el auspicio financiero del proyecto PIC-111 “Búsqueda de proteasas e inhibidores de proteasas vegetales con aplicaciones industriales y biomédicas, ETAPA I”, que se ejecuta en el Departamento de Ciencias Nucleares, Laboratorio de Investigaciones Aplicadas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme permitido realizar este proyecto en compañía de mi familia, de Omar y junto a personas de una gran calidad humana y profesional.

Agradezco a mi familia, por el apoyo durante este tiempo y el que he tenido durante toda mi vida; a Omar, por sus consejos y ayuda siempre oportuna; y por supuesto, por el amor que ellos constantemente me dan.

Agradezco al Dr. Patricio Castillo por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto, por su ayuda, su guía, sus enseñanzas y su interés en todo momento.

Agradezco a la Dra. Florinella Muñoz por haberme permitido realizar este proyecto en el Laboratorio de Investigaciones Aplicadas (LIA) y por su apoyo en los momentos en que lo necesité, a Pao, a todos los que pertenecen al LIA y a todos los compañeros que estuvieron mientras realicé el proyecto; por su ayuda, sus enseñanzas, su interés, sus consejos y sobre todo su amistad.

Agradezco al Ing. José Velásquez y al Ing. Eduardo Peralta por haberme facilitado gentilmente la obtención de las semillas de leguminosas y gramíneas producidas en el INIAP.

Agradezco a la Ing. Neyda Espín y a la Ing. Mary Casa por su colaboración en la revisión y mejora de este proyecto.

Agradezco a mis compañeros y profesores de la carrera, por su amistad, su ayuda, sus consejos y sus enseñanzas.

¡Sin ustedes este proyecto no habría sido posible!

Finis Coronat Opus

DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a mi mami, a mi papi,
a mi hermana, a mi hermano y a mi Omar.
Los esfuerzos realizados siempre valen la pena,
para cumplir sus sueños y sus objetivos,
con el fin de hacer el bien
y sacrificarse por el bien propio y de los demás.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Plantaciones de leguminosas y gramíneas presentes en el Ecuador	1
1.1.1. Taxonomía	1
1.1.2. Morfología general	3
1.1.3. Propagación y ciclo de cultivo	4
1.1.4. Descripción y caracterización de las semillas de leguminosas y gramíneas	5
1.1.5. Semillas de <i>Lupinus</i> spp.	8
1.1.6. Presencia de leguminosas y gramíneas en el Ecuador	8
1.1.7. Importancia económica de las leguminosas y gramíneas	9
1.2. Inhibidores de proteasas	10
1.2.1. Proteasas	10
1.2.2. Inhibidores	11
1.2.3. Clasificación	13
1.2.3.1. Inhibidores de Bowman-Birk (BBI)	14
1.2.3.2. Inhibidores de Kunitz	15
1.2.4. Aplicaciones de los inhibidores de proteasas	15
1.3. Métodos de purificación de inhibidores de proteasas	16
1.3.1. Ultrafiltración con centrifugación	16
1.3.2. Tratamiento térmico	17
1.3.3. Precipitación de proteínas	18
1.3.4. Cromatografía de filtración en gel	18
1.4. Determinación de la actividad inhibidora	19
1.4.1. Determinación de la actividad enzimática	20
1.4.2. Determinación de la concentración de proteína	21
1.4.3. Evaluación de preparados de inhibidores de proteasas	21
2. PARTE EXPERIMENTAL	23
2.1. Objetivos	23
2.1.1. Objetivo general	23
2.1.2. Objetivos específicos	23
2.2. Materiales, reactivos y equipos	23
2.2.1. Materiales	23
2.2.1. Reactivos	24
2.2.2. Equipos	24

2.3.	Pruebas preliminares para la caracterización de extractos de chocho con actividad inhibidora sobre la tripsina, con el uso de espectrofotometría	24
2.3.1.	Determinación de la actividad proteolítica de la tripsina	24
2.3.2.	Obtención de permeado de chocho	26
2.3.3.	Determinación de la actividad inhibidora de permeado de chocho	27
2.4.	Determinación de un procedimiento general de obtención de extractos inhibidores de proteasas a partir de leguminosas y gramíneas recolectadas	28
2.4.1.	Determinación de la concentración de proteína en los permeados obtenidos	29
2.4.2.	Determinación de la actividad inhibidora específica	30
2.5.	Purificación parcial del extracto de chocho y de los extractos inhibidores más activos	30
2.5.1.	Tratamiento térmico	30
2.5.2.	Precipitación de proteínas con TCA	31
2.5.3.	Aplicación de tratamiento térmico y TCA	32
2.5.4.	Actividad inhibidora y purificación parcial de los retenidos de la especie seleccionada y del chocho	33
2.6.	Evaluación de los procesos de purificación	33
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.1	Estudio preliminar de la inhibición de tripsina con permeado de chocho (<i>L. mutabilis</i> , var. I-450-Andino)	34
3.1.1.	Determinación de la actividad proteolítica de la tripsina	34
3.1.2.	Actividad inhibidora de la tripsina del permeado de chocho	35
3.1.3.	Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de permeado de chocho	36
3.2	Actividad inhibidora de la tripsina del permeados de semillas de leguminosas y gramíneas	37
3.2.1	Actividad inhibidora de los permeados de leguminosas	37
3.2.2	Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados de leguminosas	38
3.2.3.	Actividad inhibidora de los permeados de gramíneas	41
3.2.4.	Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados de gramíneas	42
3.3	Selección de tres permeados con mayor actividad inhibidora de la tripsina	43
3.4	Purificación parcial del permeado de chocho y de los tres permeados preseleccionados	44
3.4.1.	Tratamiento térmico con baño maría	45
3.4.1.1.	Actividad inhibidora de los permeados purificados con tratamiento térmico	45

3.4.1.2.	Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados purificados con tratamiento térmico	47
3.4.2.	Precipitación de proteínas con TCA	51
3.4.2.1.	Actividad inhibidora de los permeados purificados con precipitación de proteínas con TCA	51
3.4.2.2.	Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados purificados con precipitación de proteínas con TCA	53
3.4.3.	Tratamiento térmico con baño maría y precipitación de proteínas con TCA	56
3.4.3.1.	Actividad inhibidora de los permeados purificados con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA	56
3.4.3.2.	Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados purificados con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA	59
3.5	Evaluación de la purificación parcial del permeado de chocho y de los tres permeados preseleccionados	62
3.5.1.	Evaluación de la purificación con tratamiento térmico	62
3.5.2.	Evaluación de la purificación con precipitación de proteínas con TCA	64
3.5.3.	Evaluación de la purificación con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA	66
3.6.	Selección del permeado con mayor actividad inhibidora de tripsina	68
3.7.	Actividad inhibidora de la tripsina de los retenidos de arveja (<i>P. sativum</i> , var. I-432-Lojanita) y chocho (<i>L. mutabilis</i> , var. I-450-Andino)	69
3.7.1.	Retenido de chocho purificado con tratamiento térmico	70
3.7.2.	Retenido de arveja purificado con precipitación de proteínas con TCA	71
3.7.3.	Retenido de arveja purificado con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA	71
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73
4.1.	Conclusiones	73
4.2.	Recomendaciones	75
	BIBLIOGRAFÍA	76
	ANEXOS	88

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1:	Composición química (% MS) de algunas de las principales leguminosas	6
Tabla 1.2:	Actividad inhibidora de la tripsina de algunas leguminosas	7
Tabla 1.3:	Composición química de algunas de las principales gramíneas (100 g de porción comestible)	7
Tabla 1.4:	Actividad inhibidora de la tripsina de algunas gramíneas	8
Tabla 1.5:	Actividad enzimática residual de la tripsina de vísceras de la sardina <i>Sardinops sagax caerulea</i> con el uso de algunos inhibidores	13
Tabla 1.6:	Familias de inhibidores de proteasas	14
Tabla 1.7:	Características de las columnas PD-10	19
Tabla 3.1:	Actividad proteolítica de la tripsina sobre BApNA disuelto en DMF	34
Tabla 3.2:	Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados de semillas de leguminosas	37
Tabla 3.3:	Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados de semillas de leguminosas	39
Tabla 3.4:	Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados de semillas de gramíneas	41
Tabla 3.5:	Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados de semillas de gramíneas	42
Tabla 3.6:	Permeados preseleccionados por su mayor actividad inhibidora de la tripsina	44
Tabla 3.7:	Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados purificados parcialmente con tratamiento térmico	45
Tabla 3.8:	Actividades inhibidoras de los permeados crudos y purificados térmicamente	46
Tabla 3.9:	Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados purificados parcialmente con tratamiento térmico	48
Tabla 3.10:	Actividades inhibidoras específicas de los permeados crudos y purificados térmicamente	50

Tabla 3.11:	Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados purificados parcialmente con precipitación de proteínas con TCA	51
Tabla 3.12:	Actividades inhibidoras de los permeados crudos, purificados térmicamente y purificados con TCA	52
Tabla 3.13:	Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados purificados con precipitación de proteínas con TCA	54
Tabla 3.14:	Actividades inhibidoras específicas de los permeados crudos, purificados térmicamente y purificados con TCA	55
Tabla 3.15:	Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados purificados con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA	57
Tabla 3.16:	Actividades inhibidoras de los permeados crudos, purificados térmicamente, purificados con TCA y purificados térmicamente y con TCA	58
Tabla 3.17:	Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados purificados con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA	59
Tabla 3.18:	Actividades inhibidoras específicas de los permeados crudos, purificados térmicamente, purificados con TCA y purificados térmicamente y con TCA	61
Tabla 3.19:	Rendimiento en proteína, en actividad inhibidora y grado de purificación de los permeados preseleccionados y del chocho con tratamiento térmico	63
Tabla 3.20:	Rendimiento en proteína, actividad inhibidora de tripsina y grado de purificación de los permeados purificados con precipitación de proteínas con TCA	65
Tabla 3.21:	Rendimiento en proteína, actividad inhibidora de tripsina y grado de purificación de los permeados purificados con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA	67
Tabla B.1.	Comparación de promedios de las concentraciones proteicas obtenidas de los permeados crudos y purificados térmicamente	91
Tabla C.1.	Concentración de proteína y actividad inhibidora totales para el permeado de chocho sin purificación y con tratamiento térmico	92

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1.1: Síntesis de la clasificación taxonómica de la familia Leguminosa	2
Figura 1.2: Síntesis de la clasificación taxonómica de la familia Gramínea	3
Figura 1.3: Clasificación de la enzima tripsina	11
Figura 2.1: Diagrama del proceso para la determinación de la actividad proteolítica de la tripsina con BApNA en DMF como sustrato	25
Figura 2.2: Diagrama del proceso para la determinación de la hidrólisis espontánea de BApNA en DMF	25
Figura 2.3: Diagrama del procedimiento de obtención del extracto crudo de chocho (<i>L. mutabilis</i> var. I-450-Andino)	26
Figura 2.4: Procedimiento para la determinación de la actividad proteolítica de la tripsina con permeado crudo de chocho (<i>L. mutabilis</i> , var. I-450-Andino)	27
Figura 2.5: Procedimiento para la determinación de la actividad proteolítica de la tripsina sin extracto crudo de chocho (<i>L. mutabilis</i> , var. I-450-Andino)	28
Figura 2.6: Diagrama de procesos para determinar la concentración de proteína	29
Figura 2.7: Purificación parcial de los permeados preseleccionados y del permeado de chocho con tratamiento térmico	31
Figura 2.8: Purificación parcial de los permeados preseleccionados y del permeado de chocho con precipitación de proteínas con TCA	31
Figura 2.9: Eliminación de partículas grandes del retenido de la especie seleccionada y del chocho para la determinación de la actividad inhibidora de la tripsina	33
Figura 3.1: Actividad inhibidora de la tripsina de los tres permeados crudos preseleccionados y el permeado de chocho	44
Figura 3.2: Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados purificados con tratamiento térmico	47
Figura 3.3: Actividad inhibidora específica de los permeados purificados térmicamente	49
Figura 3.4: Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados purificados con precipitación de proteínas con TCA	52

Figura 3.5:	Actividad inhibidora específica de los permeados purificados con precipitación de proteínas con TCA	55
Figura 3.6:	Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados purificados térmicamente y con TCA	57
Figura 3.7:	Actividad inhibidora específica de los permeados purificados térmicamente y con TCA	61
Figura 3.8:	Actividades inhibidoras de los tres permeados preseleccionados y del chocho, en estado crudo y con los diferentes métodos de purificación parcial	69

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO A	
Ejemplo de cálculo de la actividad proteolítica de la tripsina y de la actividad inhibidora de la tripsina	90
ANEXO B	
Comparación de los promedios de las concentraciones proteicas obtenidas de los permeados crudos y purificados térmicamente	92
ANEXO C	
Ejemplo de cálculo de los parámetros de evaluación de la purificación parcial de los permeados	93

Lista de abreviaturas

- A_B : actividad proteolítica con BApNA, en U/mL de solución de enzima.
- ΔDO_{400} : diferencia de la DO de la mezcla de reacción con solución enzimática y la DO de la mezcla para la hidrólisis espontánea.
- Δt : tiempo en el que se mide el avance de la reacción.
- V_c : volumen de la mezcla de reacción en μL .
- V_e : volumen de la solución enzimática utilizada en la mezcla de reacción, en μL .
- 1000: factor de conversión de mol/L a $\mu\text{mol/mL}$.
- L: longitud del paso de la luz en la celda (1 cm).
- DO_{280} : densidad óptica medida a 280 nm.
- f: factor de dilución.
- ϵ : coeficiente de extinción del compuesto de interés
- A_{esp} : actividad específica, en unidades internacionales por mg de proteína (U/mg).
- AI: actividad inhibidora, en U/mL de extracto inhibidor.
- [P]: concentración de proteína, en mg/mL.

GLOSARIO

1. Amilasa: es un enzima perteneciente al grupo de las hidrolasas, cuya función es la de catalizar la hidrólisis del glucógeno y el almidón para formar azúcares simples, se produce principalmente en las glándulas salivares y en el páncreas.

2. Antioxidante: es cualquier molécula o sustancia que neutraliza los radicales libres y previene la oxidación de las moléculas.

3. Bráctea: es una hoja modificada físicamente y se encuentran junto a la flor.

4. Catalizador: es una sustancia que interactúa con los reactivos de una reacción química y acelera la velocidad de dicha reacción sin actuar en la misma.

5. Celulosa: es un hidrato de carbono polimérico que se encuentra en las paredes celulares de las plantas.

6. Diálisis: es la separación de las moléculas de una solución por la diferencia en sus índices de difusión a través de una membrana selectivamente permeable.

7. Enlace peptídico: es un enlace covalente que se produce entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro aminoácido, con la formación de una molécula de agua.

8. Estolones: son tallos rastreros que nacen de la base de los tallos principales. Pueden desarrollarse sobre la superficie del suelo o debajo de este.

9. Factor hageman: es una proteína plasmática que pertenece al grupo de los factores de coagulación, su nombre sistemático es factor XII y es una enzima que pertenece a la clase de las serino proteasas.

10. Fibra dietética: son los polisacáridos vegetales y la lignina que son resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas del ser humano.

11. Fijación simbiótica de nitrógeno: obtención de nitrógeno para determinadas especies vegetales que se encuentran en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno.

12. Hiperplasia: es el aumento del tamaño de un órgano o tejido, debido a que sus células han aumentado en número.

13. Hipertrofia: es el desarrollo excesivo de un órgano o de una parte del cuerpo sin que se altere su estructura, debido al aumento del tamaño de cada célula.

14. Kalikreina: es una serino proteasa clave para la regulación de procesos inflamatorios y de coagulación.

15. Organismos monogástricos: son todos aquellos animales que tienen un estómago simple.

16. Pelos absorbentes: son filamentos diminutos que recubren las raíces y absorben el agua y las sales minerales del suelo.

17. Planta transgénica: es una planta que contiene uno o más genes que han sido insertados en forma artificial.

18. Propiedades organolépticas: son aquellas que se perciben a través de los sentidos.

19. Proteínas recombinantes: son proteínas producidas en el laboratorio mediante ingeniería genética en células distintas a las que se producen en la naturaleza

20. Raíz pivotante: es aquella que se encuentra más desarrollada que las raíces secundarias.

21. *Rhizobium*: es un género de bacterias fijadoras de nitrógeno que infectan y colonizan las raíces y provocan deformaciones conocidas como nódulos.

22. Simbiosis: es la asociación de dos organismos que se benefician mutuamente sin ningún perjuicio.

23. Yema vegetal: es un brote de una planta, que surge del tallo y está formado por un grupo de hojas compactas, de ella pueden nacer ramas, hojas o flores.

24. Zimógeno: es un precursor enzimático inactivo.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la actividad inhibidora de la tripsina con extractos de semillas de chocho (*Lupinus mutabilis*, var I-450-Andino) y con otras leguminosas y gramíneas producidas en el Ecuador.

En pruebas preliminares con semillas de chocho, se obtuvo un extracto que se ultrafiltró con centrifugación y se obtuvo un retenido y un permeado. La actividad inhibidora de la tripsina con permeado crudo de chocho fue de $28,50 \pm 0,73$ mU/mL. Se estableció un procedimiento general con el que se obtuvieron permeados crudos de semillas de fréjol vars. I-414-Yunguilla, I-427-Libertador, I-412-TOA, I-406-Guarandeño, I-418-Je.Ma.; arveja var. I-432-Lojanita; cebada var. INIAP-Cañicapa; haba var. Chaucha; lenteja var. I-406; una línea de centeno; entre otras, que presentaron actividad inhibidora de la tripsina. Se seleccionaron los permeados crudos de arveja (*P. sativum*, var. Lojanita); fréjol (*P. vulgaris*, var. I-414-Yunguilla) y cebada (*H. vulgare*, var. INIAP-Cañicapa), que mostraron las mayores actividades inhibidoras. Estos permeados y el de chocho fueron purificados parcialmente con tratamiento térmico a 60 °C, precipitación de proteínas con TCA al 5 % y la combinación de ambos métodos, cada uno por separado. Se seleccionó el permeado de arveja purificado con la combinación del tratamiento térmico y del TCA por la mayor actividad inhibidora de la tripsina, igual a $45,07 \pm 1,04$ mU/mL y un rendimiento en actividad de 432,23 %.

Se obtuvo actividad inhibidora con el retenido de chocho purificado térmicamente, igual a $65,35 \pm 0,20$ mU/mL y con los retenidos de arveja purificados con TCA y con la combinación de ambos métodos de purificación, iguales a $16,62 \pm 0,19$ mU/mL y $16,53 \pm 0,79$ mU/mL, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos entre los aminoácidos que conforman las proteínas. Poseen funciones tan importantes como la degradación de las proteínas, el desarrollo, crecimiento y muerte programada de las células, entre otras; por lo que se encuentran en todos los organismos vivos (López, 2 000).

Los inhibidores de proteasas son moléculas proteicas que se encuentran en todos los niveles de organización del mundo viviente y son los encargados de regular la actividad de estas enzimas. Los más estudiados han sido los de tripsina, ya que es una enzima digestiva de gran importancia en los animales monogástricos. Los inhibidores de proteasas de origen vegetal se han encontrado en los tejidos de almacenamiento, como las semillas o en algunas partes aéreas, como las hojas. La mayoría de ellos son proteínas solubles de bajo peso molecular (Pascual, 2 005).

Las leguminosas y las gramíneas contienen inhibidores de tripsina, lo cual hace que al ser ingeridas, dificulten la digestión y aprovechamiento de los aminoácidos y disminuya el valor nutricional de las semillas de estas plantas. Por otro lado, estos inhibidores intervienen en los procesos digestivos de los organismos patógenos y disminuyen el crecimiento de estos por la interferencia de sus procesos digestivos (Cameán, 2 007).

Esta actividad ha motivado la búsqueda, identificación y caracterización de inhibidores de proteasas para su uso en la agricultura, biotecnología, biomedicina y en el diagnóstico o terapéutica de enfermedades tan diversas como el cáncer, el Alzheimer; desórdenes inmunológicos, inflamatorios, respiratorios; infecciones parasitarias, fúngicas y virales, como la malaria, el virus del VIH, hepatitis, entre otras (García *et al.*, 2 009).

El presente trabajo contribuye al aislamiento y purificación parcial de moléculas proteicas con actividad inhibidora de la tripsina en semillas vegetales disponibles

en el Ecuador. Se determinó la actividad inhibidora de la tripsina en un permeado de semillas de chocho. Se estableció un procedimiento general con el que se obtuvieron permeados de diferentes semillas de leguminosas y gramíneas con actividad inhibidora de la tripsina. Se seleccionó un permeado purificado parcialmente, que presentó la mayor actividad inhibidora y también se determinó la presencia de actividad inhibidora en los retenidos purificados parcialmente de la especie más activa y del chocho.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. PLANTACIONES DE LEGUMINOSAS Y GRAMÍNEAS PRESENTES EN EL ECUADOR

1.1.1. TAXONOMÍA

En primer lugar, la familia de las Leguminosas posee un estimado de 700 géneros, 18 000 especies y tienen diferentes clasificaciones, según Machado y Menéndez en Funes *et al.* (1 986).

En algunas clasificaciones taxonómicas, las subfamilias *Vicioideae* y *Phaseoloideae* forman una sola subfamilia denominada *Papilionoideae*, que es la más importante porque abarca cerca de 12 000 especies, principalmente herbáceas que se encuentran distribuidas en todo el mundo (Sierra, 2 005).

En segundo lugar, se tiene a la familia de las Gramíneas que consta de 7 subfamilias con casi 700 géneros, estos poseen 28 tribus y un total de 12 000 especies.

En la Figura 1.1., se presentan algunas de las subfamilias, tribus y géneros más relevantes de la familia de Leguminosas, para este estudio.

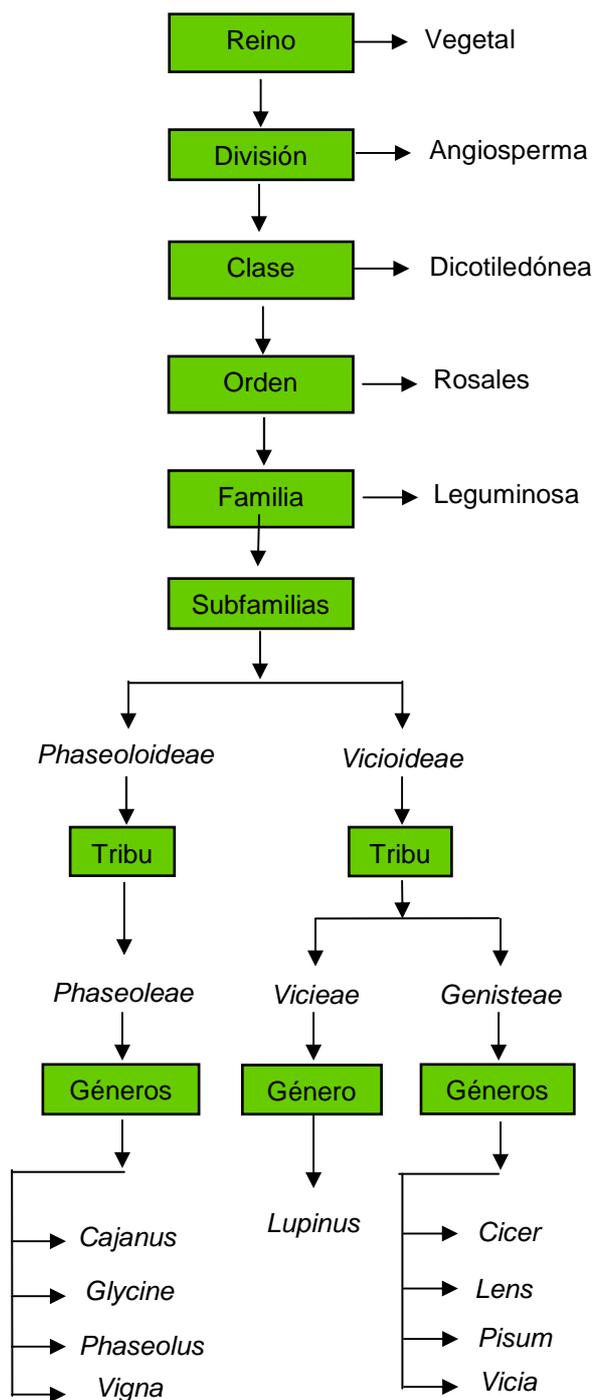


Figura 1.1. Síntesis de la clasificación taxonómica de la familia Leguminosa (Sierra, 2 005)

En la Figura 1.2., se presenta una síntesis de la clasificación taxonómica de las gramíneas, con algunas subfamilias, tribus y géneros más relevantes para este estudio (Estrada, 2 002; Hospital La Fe de Valencia, 2 002).

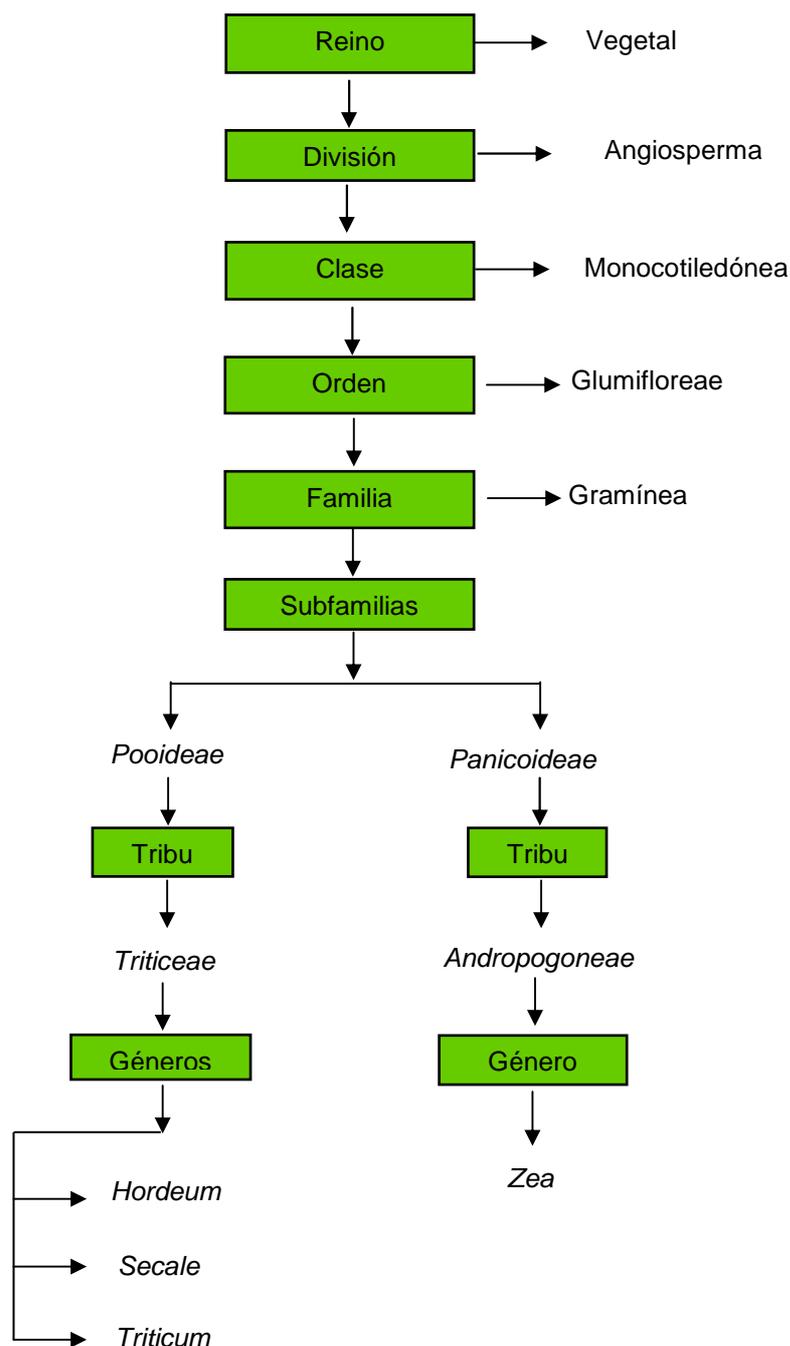


Figura 1.2. Síntesis de la clasificación taxonómica de la familia Gramínea (Gastelum, 2 009; Tovar, 1 993)

1.1.2. MORFOLOGÍA GENERAL

Las especies de la familia leguminosa pueden ser herbáceas o arbóreas. El tipo y la forma del tallo en las especies arbóreas es leñoso y grueso al igual que sus raíces, a diferencia de las especies herbáceas, el cual es meduloso, ramificado y

nutritivo; por lo general son erguidos, pero pueden ser rastreros o trepadores y flexibles. Las especies trepadoras pueden ser volubles, las cuales se enrollan sobre un tutor, o endebles, que trepan por medio de zarcillos foliares y pueden presentar espinas o aguijones.

Se caracterizan por tener una raíz pivotante, con raíces secundarias, pelos absorbentes y nódulos laterales.

Las hojas son de varias formas y tamaños, simples o compuestas; las flores son completas y de formas diferentes. El fruto es una legumbre o vaina y en su interior se encuentran las semillas, que tienen diferentes tamaños y son de forma alargada y comprimida (Sierra, 2 005).

Por otro lado, la familia de las gramíneas o poáceas, tienen raíces secundarias y generalmente superficiales. Las hojas son acintadas, delgadas y rodean el tallo por un extremo, con nervaduras paralelas.

Los tallos son cilíndricos o semi-aplanados con nudos y en el interior son huecos. Las inflorescencias son espiguillas compuestas por flores escalonadas en sus ramificaciones y los frutos son espigas con semillas o carióspsides. Muchas especies poseen tallos subterráneos o rizomas, con brácteas que dan origen a nuevas raíces (Estrada, 2 002).

1.1.3. PROPAGACIÓN Y CICLO DE CULTIVO

Las leguminosas son perennes o anuales y se desarrollan mejor cuando pueden obtener agua al iniciar su crecimiento, luego necesitan un período seco y cálido para la maduración. Su propagación se realiza a través de semillas (Nadal *et al.*, 2 004; Latham, 2 002; Hospital La Fe de Valencia, 2 002).

En cambio, las gramíneas son casi siempre herbáceas, anuales o perennes. Pueden propagarse vegetativamente por división de matas, separación de estolones y rizomas, así como por fragmentación de las cañas; sobre todo cuando

la reproducción de semillas es escasa. También se practica la reproducción por yemas y en la naturaleza es muy frecuente la reproducción por semillas. (Nicola y Rùgolo, 1 987; Herbario de la Universidad Pública de Navarra, 2 011).

1.1.4. DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS SEMILLAS DE LEGUMINOSAS Y GRAMÍNEAS

La semilla de una planta de leguminosa o gramínea consta de tres partes principales que son:

- a) Embrión: es la parte que crecerá para formar la nueva planta (plántula).
- b) Endosperma: es la sustancia nutritiva que utilizará la plántula para crecer hasta desarrollar una hoja verde. Las leguminosas no poseen endosperma, la reserva de nutrientes se halla en los cotiledones, los cuales son parte del embrión. El endosperma de las semillas de gramíneas está rodeado por la capa de aleurona (gluten).
- c) Envolturas: son tejidos que protegen a la plántula y pueden ayudar a su rápido desarrollo. En las gramíneas, se encuentran adheridas al pericarpio del fruto, mientras que en las leguminosas se encuentran rodeando los cotiledones (Perissé, 2 002; Organización de las Naciones Unidas, 1 985).

Las semillas de las leguminosas son uno de los recursos más importantes como fuente de proteínas para la humanidad y para los animales. En los últimos años, se ha incrementado el interés por el género *Lupinus*, debido a su alto contenido de proteína, minerales, fibra dietética y grasa, en algunas especies. Poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, entre otras y pueden crecer bajo condiciones ambientales y edáficas en las que no tolerarían otras especies (Lqari *et al.*, 2 004; Espinoza, 2 006). En la Tabla 1.1., se observa la composición química de algunas de las principales leguminosas.

Tabla 1.1. Composición química (% MS) de algunas de las principales leguminosas

Compuestos	Haba (<i>V. faba</i>)	Arveja (<i>P. sativum</i>)	Chocho (<i>Lupinus sp.</i>)	Garbanzo (<i>C. arietinum</i>)	Soya integral (<i>G. max</i>)
Proteína Bruta	27,00	26,20	40,10	27,20	37,00
Almidón	40,90	49,50	-	42,00	-
Fibra Bruta	8,30	6,30	16,10	3,30	6,00
Grasa	1,14	1,45	9,90	5,00	18,00
Aminoácidos (g/100 g PB)					
Lisina	5,12	7,91	4,57	6,27	6,35
Met + Cys	2,08	2,48	2,17	3,12	3,10
Triptófano	0,83	0,90	0,78	0,80	1,30
Treonina	2,18	3,95	3,61	2,89	3,89

Fuente: Carabaño y Villamide, 1 996

Las semillas de leguminosas se caracterizan por su bajo contenido de aminoácidos azufrados y triptófano, pero son ricos en lisina. Este contenido depende de las variedades y de los métodos analíticos utilizados.

El contenido de proteínas no se relaciona directamente con el contenido de aminoácidos debido a las diferentes proteínas constitutivas y de reserva que poseen (Carabaño y Villamide, 1 996; Espinoza, 2 006).

Además, poseen compuestos denominados factores antinutricionales (FAN) entre los que se encuentran los inhibidores de proteasas. Estas moléculas tienen como finalidad, proteger el crecimiento de las plantas del ataque de insectos, hongos, bacterias, etc. Sin embargo, pueden afectar el crecimiento o la salud de ciertos animales debido a la inhibición de la actividad de proteasas como la tripsina, que es una enzima indispensable en la digestión de los organismos que la poseen (Carabaño y Villamide, 1 996).

En las semillas de las leguminosas, los inhibidores de proteasas pueden estar presentes tanto en la envoltura como en los cotiledones, lo cual depende de la variedad que se analice (Daroch, 2 002; Iniestra *et al.*, 2 005). En la Tabla 1.2., se observa el valor de la actividad inhibidora de la tripsina de algunas leguminosas.

Tabla 1.2. Actividad inhibidora de la tripsina de algunas leguminosas

Leguminosas	Actividad inhibidora de la tripsina (UI/mg)
Haba (<i>Vicia faba</i>)	0,50 - 6,20
Garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>)	1,68 - 11,90
Soya (<i>Glycine max</i>)	21,10 - 74,50
Chocho (<i>Lupinus sp.</i>)	0,16 - 0,29
Fréjol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	10,90 - 25,90
Arveja (<i>Pisum sativum</i> var. de primavera)	2,30 - 4,90
Arveja (<i>Pisum sativum</i> var. de invierno)	7,90 - 15,90

Fuente: Carabaño y Villamide, 1 996

Por otro lado, las semillas de todas las gramíneas, como los cereales, contienen una composición química y un valor nutritivo parecidos. Poseen carbohidratos y grasas que aportan energía y su proteína vegetal es variable según la especie, variedad y condiciones de cultivo. En la Tabla 1.3., se muestra la composición química media de algunas gramíneas en estado crudo y seco (FAO, 1 990).

Tabla 1.3. Composición química de algunas de las principales gramíneas (100 g de porción comestible)

Compuesto	Harina integral trigo (<i>Triticum spp</i>)	Sorgo entero (<i>S. vulgare</i>)	Mijo perla (<i>P. glaucum</i>)	Arroz pálido (<i>O. sativa</i>)
Proteína (g)	12,20	10,40	11,00	7,00
Carbohidratos (g)	69,00	71,00	69,00	80,00
Fibra (g)	2,00	2,00	2,00	0,20
Grasa (g)	2,30	3,40	5,00	0,50
Tiamina (mg)	0,40	0,50	0,15	0,06
Niacina (mg)	5,00	3,50	2,00	1,00

Fuente: FAO, 1 990

Las semillas de las gramíneas son ricas en aminoácidos azufrados, por lo que se complementan con las semillas de las leguminosas. Las semillas de las gramíneas, al igual que las semillas de las leguminosas, también poseen componentes antinutricionales (FAN) como los inhibidores de proteasas, que inhiben la actividad de enzimas digestivas como la tripsina; y pueden encontrarse

en el germen y en el salvado (Blanco y Aguirre, 2 002; Hernández y Gallegos, 1 999; Espinoza, 2 006). En la Tabla 1.4., se indica la actividad inhibidora de la tripsina encontrada en algunas gramíneas.

Tabla 1.4. Actividad inhibidora de la tripsina de algunas gramíneas

Gramíneas	Actividad inhibidora de la tripsina (UI/mg)
Cebada	1,60
Trigo	0,14
Maíz	0,80

Fuente: Carabaño y Fraga, 2 007

1.1.5. SEMILLAS DE *Lupinus* spp.

El género *Lupinus* está representado por más de 300 especies, de las cuales se han domesticado cuatro que son: *L. mutabilis*, *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*. Las semillas o granos de las especies domesticadas presentan una alta calidad nutricional. La proteína total presente en la harina de las semillas de chocho es relativamente rica en lisina, aunque deficiente en aminoácidos azufrados como metionina y cisteína; es la mayor fuente de energía digerible al igual que los lípidos y posee una mayor digestibilidad que otras fuentes proteicas vegetales o animales. El contenido de aceite depende de la especie y puede estar entre el 5,60 y 12,00 % (Espinoza, 2 006).

Como todas las semillas de leguminosas, los granos de chocho poseen factores antinutricionales (FAN), que limitan el uso directo del grano crudo en la alimentación humana y animal. Un ejemplo de FAN son los inhibidores de proteasas, que actúan sobre ciertas enzimas proteolíticas (Rodríguez, 2 009).

1.1.6. PRESENCIA DE LEGUMINOSAS Y GRAMÍNEAS EN EL ECUADOR

A nivel nacional, las leguminosas y gramíneas ocupan la mayor cantidad de superficie agrícola, con casi el 40,00 % del área cosechada. La superficie de

leguminosas y gramíneas es más representativa en la Sierra que en las demás regiones, con el 33,00 y 49,89 %, respectivamente. Sin embargo, el Ecuador es deficitario en la producción de gramíneas, solo produce el 57,90 % del maíz duro que necesita y el 2,00 % del trigo. De igual manera, es deficitario en la producción de leguminosas, oleaginosas, entre otros (FAO, 2 006).

Los principales cultivos de gramíneas son el maíz duro, amarillo, suave, seco, choclo; quinua, trigo y cebada. El arroz es el cultivo más extenso del país, según el Censo Nacional Agropecuario del 2 002 y es el más importante del Ecuador en términos sociales, productivos y calóricos (Paredes, 2 009).

En cuanto a las leguminosas, se registran como especies de grano comestible de interés económico, ecológico y social al fréjol común, la arveja, el haba, el chocho, la lenteja y el guandúl. Las cuatro primeras se encuentran en la Sierra (altoandinas) y la última en la Costa, tanto en grano seco, tierno, procesado o para la agroindustria (Peralta *et al.*, 1 995).

1.1.7. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LAS LEGUMINOSAS Y GRAMÍNEAS

Por un lado, las leguminosas proporcionan nitrógeno extra al suelo, por la fijación simbiótica de *Rhizobium*, lo que representa una ventaja económica adicional para el agricultor. En la producción ganadera, las leguminosas forrajeras contribuyen a su alimentación, debido a su composición rica en proteína. Estos beneficios también favorecen a las gramíneas que sirven de alimento al ganado, por lo que se obtiene un alto rendimiento de leche y carne (Ernst, 2 004; Quintana *et al.*, 2 006).

Las leguminosas, además, mejoran la calidad organoléptica de las pasturas y producen sustancias tóxicas que evitan la presencia de plagas. Los productos obtenidos de leguminosas contribuyen enormemente a la economía del mundo, como alimentos (para animales y humanos), bebidas, fármacos, entre otros; se usan en biotecnología (como las industrias de enzimas), en la elaboración de

textiles, fertilizantes, control de plagas, etc. (Jardines Botánicos Reales, 2005; Fraile *et al.*, 2007).

En segundo lugar, están las gramíneas que tienen una gran importancia económica debido a que se cultivan y utilizan en casi todo el mundo, son una fuente importante de alimentación de los animales herbívoros (pastos) y de las personas (arroz, maíz, cebada, trigo, etc.) (Hospital La Fe de Valencia, 2002).

De las gramíneas se obtienen productos de fermentaciones alcohólicas y otros como el azúcar, material para la construcción (*Bambusa* sp. pl.), obtención de piensos, almidón, gluten, combustibles, plásticos, resinas, entre otros (Herbario de la Universidad Pública de Navarra, 2011; Botanical-online, 2011).

1.2. INHIBIDORES DE PROTEASAS

1.2.1. PROTEASAS

Las proteasas son enzimas que catalizan la ruptura de enlaces peptídicos, lo cual es una actividad necesaria en todo el ciclo de vida de un organismo vivo (García *et al.*, 2009).

Las proteasas están involucradas directa e indirectamente en todos los procesos fisiológicos del organismo a nivel celular como el crecimiento, la diferenciación, la muerte programada (apoptosis), entre otros. Funciones tan importantes requieren de moléculas reguladoras que sean muy efectivas (Pascual, 2005).

Las proteasas también son cruciales en la propagación de enfermedades, al encontrarse involucradas en los mecanismos de replicación e infectividad de muchos patógenos para las personas, plantas y animales, por lo que los inhibidores de estas proteasas han emergido con utilidades terapéuticas efectivas (Pascual, 2005).

La tripsina (EC 3.4.21.4) es una proteasa miembro de la familia de las serino proteasas con alta especificidad por los enlaces peptídicos del extremo carboxilo de los aminoácidos arginina y lisina (Félix *et al.*, 2 005). En la Figura 1.3. se presenta la clasificación de la enzima tripsina, en la cual se pueden ver los diferentes grupos a los que pertenece.

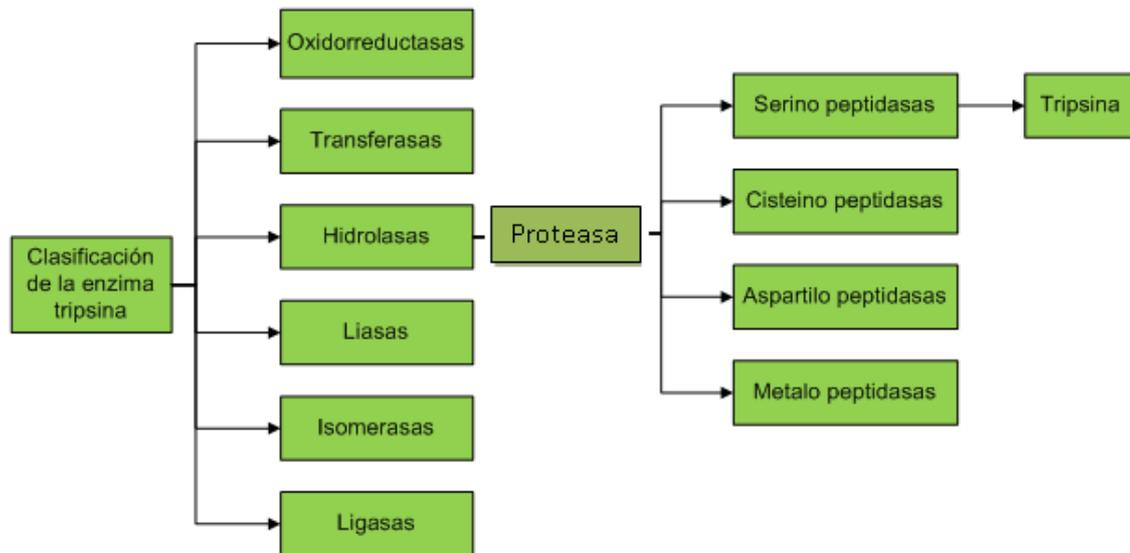


Figura 1.3. Clasificación de la enzima tripsina (Hernández, 2 007; Caffini *et al.*, 1 988)

La tripsina es segregada por el páncreas y es la más importante para el proceso de la digestión ya que una vez habilitada, activa los zimógenos de sí misma y de las demás enzimas digestivas; esta función es irreversible y necesita del inhibidor pancreático para detener su actividad (Berg *et al.*, 2 008).

Según Castillo *et al.* (2 004), la tripsina encontrada en la sardina posee un peso molecular de 22 a 28 kDa, hidroliza sustratos sintéticos como N α - benzoil-l-arginina-p-nitroanilida (BApNA), tiene un pH óptimo de 7,5 a 10,0; su temperatura óptima es de 35 a 45 °C y es inestable a bajas temperaturas y pH extremo.

1.2.2. INHIBIDORES

Los inhibidores de proteasas son proteínas que inhiben la acción de enzimas digestivas, como la tripsina o la quimotripsina. La importancia de estas moléculas

radica en su función fisiológica, la que está dirigida a la regulación de la actividad proteolítica (Brenes y Brenes, 1 993; Pascual, 2 005; Espinoza 2 006).

La familia de inhibidores de proteasas es la más grande y extensa, los inhibidores de proteasas están ampliamente distribuidos en todos los niveles de organización del mundo viviente. Los inhibidores de proteasas de origen vegetal se han encontrado en tejidos de almacenamiento como semillas y tubérculos; pero, también en algunas partes aéreas como las hojas. La mayoría de ellos son proteínas solubles, de bajo peso molecular (Pascual, 2 005; Habib y Majid, 2 007; Cameán, 2 007).

En muchos casos, el material vegetal no posee solo un inhibidor, sino una serie de ellos que se diferencian en su especificidad, en su actividad y en su estabilidad térmica. Algunas fuentes vegetales principales de inhibidores de proteasas son el arroz, el garbanzo, el haba, el fréjol, el maíz, la patata, la remolacha roja y la soya (Cameán, 2 007).

Las plantas poseen estas moléculas para intervenir en los procesos digestivos de los organismos y microorganismos patógenos o artrópodos fitófagos y defenderse de ellos al disminuir el crecimiento de estos (Cameán, 2 007; Habib y Majid, 2 007; Carrillo, 2 009).

Los inhibidores de proteasas más estudiados han sido los de tripsina, ya que es una enzima digestiva de gran importancia en la digestión de los monogástricos, como del ser humano (Cameán, 2 007). En la Tabla 1.5., se presenta la actividad enzimática residual de la tripsina con el uso de algunos inhibidores como el TPCK que no afectó su actividad.

Tabla 1.5. Actividad enzimática residual de la tripsina de vísceras de la sardina *Sardinops sagax caerulea* con el uso de algunos inhibidores

Inhibidor	Actividad enzimática residual (%)
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	57
Tosil fenilalanina clorometil cetona (TPCK)	105
Inhibidor de tripsina de soya (SBTI)	0
Benzamidina	28
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	86

Fuente: Castillo *et al.*, 2 004

Plantas como las leguminosas y las gramíneas contienen inhibidores de tripsina, lo cual hace que al ser digeridas, dificulten la digestión y aprovechamiento de los aminoácidos y disminuya el valor nutricional de las semillas de estas plantas (Dávila *et al.*, 2 003).

Los inhibidores de tripsina son capaces de unirse a esta enzima para formar un complejo inactivo, esto genera efectos tóxicos como la hipertrofia del páncreas, aunque depende de la especie animal que los ingiere (Vetifarma, 2 006).

En el ser humano existe una respuesta baja a estos inhibidores; sin embargo, en ratas y gallinas se han observado efectos como hiperplasia reversible del páncreas (Jabib *et al.*, 2 002; Vetifarma, 2 006; Cameán, 2 007).

1.2.3. CLASIFICACIÓN

En general, los inhibidores vegetales están clasificados en familias, según su secuencia de aminoácidos, su estructura y sus especificidades. En el caso de los inhibidores de proteasas, los más estudiados han sido los de las serino proteasas como la tripsina, quimotripsina y subtilisina.

Dentro de los inhibidores de las serino proteasas, los más estudiados han sido los de Bowman-Birk y Kunitz, que forman parte de los principales componentes de las semillas de las leguminosas y gramíneas. La Tabla 1.6. presenta las familias de inhibidores de proteasas, las enzimas que inhiben y su distribución. En algunos

casos, inhiben también otras enzimas como la amilasa o el factor Hageman (Blanco y Aguirre, 2 002).

Tabla 1.6. Familias de inhibidores de proteasas

Familia	Enzimas inhibidas	Distribución
Bowman-Birk	Tripsina, quimotripsina, elastasa	Leguminosas, gramíneas
Kunitz	Tripsina, quimotripsina, subtilisina, kalikreina, amilasa	Leguminosas, gramíneas, aráceas, alismatáceas
Papa I	Quimotripsina, tripsina, subtilisina	Solanáceas, gramíneas, leguminosas, poligonáceas, cucurbitáceas
Papa II	Tripsina, quimotripsina	Solanáceas
Cucúrbitas	Tripsina, factor Hageman	Cucurbitáceas
Superfamilia Cereales	Amilasa, tripsina, factor Hageman	Gramíneas, crucíferas, euforbiáceas, lecitidáceas, leguminosas
Ragi A12/cebada, arroz (LTP)	Amilasa	Gramíneas
Carboxi-peptidasas	Carboxipeptidasa	Solanáceas
Tipo cistatina	Cisteín-proteasa	Gramíneas, fuentes animales

Fuente: Blanco y Aguirre 2 002

1.2.3.1. Inhibidores de Bowman-Birk (BBI)

Los BBI se han encontrado en diferentes leguminosas y gramíneas, el más estudiado es el de la semilla de soya (*Glycine max*). Han sido clasificados de acuerdo con su estructura y sus características de inhibición. Con frecuencia se encuentran en las semillas, pero también se localizan en las hojas.

Los inhibidores procedentes de plantas dicotiledóneas poseen siete puentes disulfuro, tiene un peso molecular de 8 kDa y se denominan inhibidores de doble cabeza, porque poseen lugares de unión independientes para tripsina y quimotripsina, los cuales pueden actuar simultáneamente.

Los BBI de plantas monocotiledóneas son de dos tipos, el un tipo posee un peso molecular de 8 kDa y un sitio activo; el otro tipo posee un peso molecular de 16 kDa y dos sitios activos, que no actúan juntamente. Han demostrado que actúan como componentes anticancerígenos (Habib y Majid, 2 007).

1.2.3.2. Inhibidores de Kunitz

Los inhibidores de Kunitz son los de mayor actividad inhibidora contra las serino proteasas, pero también pueden inhibir otras proteasas. Se encuentran en las leguminosas, los cereales y en algunas especies de solanáceas, en las cuales, estos inhibidores se producen bajo estrés, como en el caso de *Solanum tuberosum*. Se ha reportado actividad antifúngica del inhibidor de *Pseudostellaria heterophylla*.

Usualmente poseen un peso molecular de 18 a 22 kDa y dos puentes disulfuro con un solo sitio activo (Habib y Majid, 2 007).

1.2.4. APLICACIONES DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS

Se han realizado varios estudios, en los que se ha comprobado el papel insecticida de los inhibidores de proteasas. Inicialmente, se estudiaron los provenientes de la soya y de la papa, en ensayos *in vivo* a través de dietas artificiales o plantas transgénicas que expresen estos inhibidores; así como en pruebas *in vitro*, con el uso de proteasas de los extractos digestivos de organismos patógenos y con microorganismos como hongos, nemátodos, virus y bacterias. Por medio de la transferencia de genes, que codifican estos inhibidores se han creado plantas transgénicas como por ejemplo de tabaco. Varias de estas plantas han mostrado un grado de resistencia a un amplio rango de plagas de insectos y otros patógenos (Carrillo, 2 009).

En biotecnología, se aplican estas biomoléculas en procesos industriales para obtener proteínas naturales, recombinantes o modificadas, las cuales requieren cada vez más de la presencia de inhibidores de proteasas durante los procesos

de producción, purificación y aplicación. Garantizan altos rendimientos e incrementan la estabilidad operacional y de conservación de las proteínas de interés.

En farmacología, se han aplicado inhibidores de proteasas en el diagnóstico o terapéutica del cáncer, enfermedades cardiovasculares, respiratorias, infecciosas como el VIH, así como desórdenes neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer. Estos son ejemplos en los que se ha probado su eficiencia o las potencialidades de los inhibidores de proteasas como herramientas terapéuticas (Pascual, 2 005; García *et al.*, 2 009).

1.3. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

Para extraer proteínas de microorganismos o tejidos de animales o vegetales, se desintegran las células por frotamiento, agitación, ultrasonido, entre otros. Como medio extractor se utiliza una solución salina tamponada con fuerza iónica y pH adecuados. Se utiliza la centrifugación para retirar los residuos moleculares y las proteínas de interés se separan por métodos basados en las diferencias de peso molecular, carga, solubilidad y/o afinidad.

En cada paso, se alcanza un mayor grado de aislamiento y pureza. Si se trata de una proteína activa se puede hacer un seguimiento de su actividad específica, la cual aumentará mientras más pura se encuentre la proteína (Primo, 2 007).

1.3.1. ULTRAFILTRACIÓN CON CENTRIFUGACIÓN

La ultrafiltración es un método mediante el cual se separan partículas, de acuerdo con su peso molecular.

Para este método se utiliza la fuerza centrífuga y unidades filtradoras contenidas en tubos para centrifugación. Los tubos poseen diferentes volúmenes. Las unidades filtradoras están formadas de una membrana de celulosa, que actúa

como una fina barrera permeo-selectiva entre dos fases, permite el paso de ciertos componentes y retiene otros por acción de una fuerza impulsora, que provoca el paso de la materia a través de esta.

Las membranas poseen poros irregulares y las moléculas pueden deformarse y pasar a través de estas aberturas, por lo que se asigna a cada membrana un límite de peso molecular nominal (MWCO); es decir, el peso molecular a partir del cual la mayoría de las moléculas son retenidas eficientemente por la membrana (retención >90%) (Geanta, 2 009).

1.3.2. TRATAMIENTO TÉRMICO

El tratamiento térmico es un método utilizado para la purificación e identificación de moléculas de interés. El mantenimiento o la destrucción de los inhibidores de proteasas dependen del método que se utilice como de su estructura química. El calor altera la integridad de la estructura química sostenida por uniones disulfuro, que se destruyen bajo su acción. No se puede generalizar la termo-labilidad o termo-estabilidad de estas biomoléculas (Díaz, 2 006).

Ellenrieder *et al.* (1 980) establecieron que a mayores concentraciones de harina en suspensión acuosa, el porcentaje de inactivación de inhibidores de tripsina fue mayor, lo cual comprobaron en extractos acuosos de harina de maní (*Arachis hypogaea*), de soya (*Glycine max*) descascarada y desengrasada y de fréjol arriñonado (*Phaseolus vulgaris*).

En la industria de la alimentación animal es común y efectivo utilizar el tratamiento térmico, para eliminar o disminuir la actividad inhibidora de proteasas, solo o combinado, en forma mecánica, hidrotérmica o térmica para mejorar el valor nutricional de los alimentos procesados.

Temperaturas iguales o mayores a los 100 °C causan una disminución de la actividad inhibidora entre un (50-100) % y con la utilización de diferentes métodos de tratamiento térmico; temperaturas menores a la indicada, podrían eliminar

proteínas de mayor termolabilidad, que los inhibidores de tripsina y purificarlos (Brenes y Brenes, 1 993).

1.3.3. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas suelen precipitar con concentraciones altas de sales, las más usadas son el sulfato de amonio y el sulfato de magnesio. Otros precipitadores de proteínas son el ácido tricloroacético (TCA), las sales de metales pesados (acetato de plomo, cloruro de bario, etc.) y los disolventes orgánicos solubles en agua (etanol, acetona, etc.) (Primo, 2 007).

El método de precipitación de proteínas con TCA ha sido utilizado para extraer y purificar los inhibidores de proteasas y también para detener reacciones enzimáticas (Srivastava y Ortwerth, 1 982; Gomes, 2 005; Álvarez, 2 008).

En el caso de la purificación de los inhibidores de proteasas, el objetivo es conservar las proteínas en suspensión debido a su peso molecular pequeño comparado con el de otras proteínas como las enzimas; los inhibidores no precipitan por lo que se desecha el precipitado y se conserva la fase acuosa restante para posteriores purificaciones. A esta fase, se puede aplicar la diálisis para eliminar el TCA, de modo que no interfiera con las lecturas de actividad enzimática (Sierra y Pérez, 1 999; Fernández, 2 006).

1.3.4. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL

La cromatografía de filtración en gel es una técnica que permite separar moléculas en función de su tamaño molecular. La capacidad separadora reside en el gel que consta de un gran número de esferas porosas microscópicas. El gel hidratado se deposita adecuadamente en una columna.

Al pasar una mezcla de moléculas de diferentes tamaños, a través de la columna de gel, se produce la separación. Se obtienen, primero, las más grandes y, luego, las de menor tamaño.

Las columnas PD-10 son desechables y pre-empacadas con Sephadex G-25, un medio de separación de las moléculas de mayor peso molecular (> 5 000) de aquellas con menor peso molecular (< 1 000). Las características de las columnas PD-10 se presentan en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7. Características de las columnas PD-10

Matriz	Sephadex G-25
Rango de tamaño de partícula	85-260 μm
Volumen de relleno	8,3 mL
Altura del relleno	5 cm
Volumen de la muestra recuperada	2,5 mL
Límite de exclusión	Peso molecular 5 000
Estabilidad química	En todos los tampones comúnmente usados
Rango de pH de trabajo	2-13
Temperatura de almacenamiento	+4 a +30 $^{\circ}\text{C}$
Suministrada en	Agua destilada con 0,15 % Kathon CG/ICP Biocida

Fuente: Amersham Biosciences, 2 003

El rendimiento de proteína es mayor al 95 %, con menos del 4 % de contaminación de sal (Amersham Biosciences, 2 003).

1.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA

González *et al.* (2 008) realizaron la determinación de la actividad inhibidora mediante espectrofotometría en un ensayo enzimático con BApNA (benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida), como sustrato, y la enzima tripsina. Si existe inhibidor en la muestra, este inhibe la acción de la tripsina sobre el BApNA. Realizaron la lectura de absorbancia a 410 nm y la actividad del inhibidor de tripsina la expresaron en términos de unidad de tripsina inhibida (UTI), definida según el método de Kakade *et al.* (1 974) como el incremento de 0,01 unidades de absorbancia a 280 nm, en 20 min.

Jhons (1 987) determinó la actividad inhibidora de la tripsina con los métodos de Earlander *et al.* (1 961) y Kakade (1 969), en el que usaron como sustrato enzimático al BApNA y expresaron a la actividad inhibidora en unidades de tripsina inhibida, definida como el incremento de 0,01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 mL de solución.

El método de Earlander *et al.* (1 961) permite realizar ensayos enzimáticos, en los que se usa el sustrato BApNA para determinar la variación de absorbancia a 400 nm y cada 15 s por 3 min, producida por la formación de p-nitroanilina. Se puede utilizar para determinar la inhibición de la actividad de la tripsina al analizar la diferencia de esta con presencia de un extracto inhibidor (Comoglio *et al.*, 2 008; Sinche, 2 009).

1.4.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Existen diversos métodos para medir la velocidad de una reacción enzimática. El método espectrofotométrico permite detectar cambios en la absorbancia de luz por parte del sustrato o del producto, según su concentración. Los ensayos espectrofotométricos son los más utilizados, ya que permiten medir la velocidad de la reacción de forma continua (Villareal *et al.*, 2 008).

Para el análisis práctico de enzimas se realizan ensayos enzimáticos que pueden ser de dos clases: ensayos en los que se utiliza la enzima para medir la cantidad de sustrato presente en una reacción y en los que se mide la cantidad de enzima presente (Christensen y Palmer, 1 980). Para la medición de la actividad enzimática se toman en cuenta tres factores: producto transformado, tiempo de la transformación y cantidad de enzima o de preparación enzimática. Para expresar la actividad enzimática, la Comisión Internacional de Enzimas (IEC) recomienda las siguientes unidades:

- a) Unidad internacional (U): es la cantidad de enzima pura, material biológico o de preparación enzimática que transforma un μmol de sustrato en 1 min, en condiciones óptimas.

- b) Actividad específica: es el número de U por mg de proteína (sea de enzima pura o de una preparación).
- c) Catal: es la actividad enzimática capaz de transformar un mol de sustrato en 1 s, por tanto, una U de actividad es igual a 1/60 de μ catal. Recientemente la IEC ha recomendado el uso del "catal" (Primo, 2 007).

1.4.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Existen varios métodos espectrofotométricos para la determinación de proteínas en solución. La mayoría de proteínas presentan un máximo de absorbancia a 280 nm, debido a la presencia de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina). El método de absorbancia a 280 nm puede usarse para medir concentraciones de proteínas en un rango comprendido entre 0,1 y 0,5 mg/mL, en ausencia de sustancias que interfieran con la lectura (Universidad Peruana Cayetano Heredia, 2 006).

1.4.3. EVALUACIÓN DE PREPARADOS DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

Para determinar el éxito de un protocolo de purificación de proteínas, se puede evaluar el procedimiento con el cálculo de los siguientes parámetros:

- a) Actividad específica: se obtiene al dividir la actividad inhibidora para la concentración de proteína. Indica el valor de actividad por una unidad másica de proteína. Se espera que la actividad específica aumente después de cada método de purificación, lo cual indicaría que se eliminaron proteínas contaminantes.

$$AI_{esp} = \frac{AI \left(\frac{U}{mL} \right)}{[P] \left(\frac{mg}{mL} \right)} \quad [1.1]$$

- b) Rendimiento (R): El rendimiento en actividad (R_A) es una medida de la actividad recuperada después de cada paso de purificación (Purificación n_i), expresado como porcentaje de la actividad del extracto crudo (Purificación n_0). La actividad inicial se toma como el 100 % (ecuación 1.2). También se calcula el rendimiento en proteína (R_P), que es la cantidad de proteína de interés que se recupera después de la aplicación del método de purificación, con respecto al contenido de proteína del extracto original (ecuación 1.3).

$$R_A = \frac{\text{AI total (Purificación } n_i \text{)}(U) \times 100}{\text{AI total (Purificación } n_0 \text{)}(U)} \quad [1.2]$$

$$R_P = \frac{[P]\text{total (Purificación } n_i \text{)}(\text{mg}) \times 100}{[P]\text{total (Purificación } n_0 \text{)}(\text{mg})} \quad [1.3]$$

Se espera que el R_P sea menor al 100 %, que indicaría que se eliminaron proteínas que no son de interés. Por otro lado, el R_A puede ser menor o mayor al 100 %, lo cual depende de si se eliminaron o no proteínas que interferían con la actividad de los inhibidores o se afectaron moléculas de inhibidores.

- c) Grado de purificación (GP): mide el incremento en pureza de la proteína de interés y se obtiene al dividir la actividad específica después de cada paso de purificación, por la actividad específica del extracto inicial. Se espera que este parámetro sea mayor a 1 vez, lo cual indica que el extracto se ha purificado (ecuación 1.4) (Berg, 2 008).

$$GP = \frac{\text{AI esp (Purificación } n_i \text{)} \left(\frac{U}{\text{mg}}\right)}{\text{AI esp (Purificación } n_0 \text{)} \left(\frac{U}{\text{mg}}\right)} \quad [1.4]$$

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los extractos inhibidores más eficaces de tripsina obtenidos de semillas de leguminosas o gramíneas, purificados parcialmente.

2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar la actividad inhibidora de tripsina, presente en el extracto acuoso de semillas de chocho (*Lupinus mutabilis*).
- b) Establecer un procedimiento general, que permita obtener actividad inhibidora de tripsina, a partir de semillas de leguminosas y gramíneas seleccionadas.
- c) Seleccionar el extracto inhibidor de tripsina más activo.

2.2. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

2.2.1. MATERIALES

Para el desarrollo de este proyecto, se utilizaron los siguientes materiales: harina de semillas de leguminosas y gramíneas, obtenidas en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP); agua destilada; vasos de precipitación; tubos de ensayo; celdas de cuarzo para espectrofotometría; micropipetas ajustables de 5 a 50 μL y de 100 a 1 000 μL ; y, tubos Amicon Ultra.

2.2.2. REACTIVOS

- Ácido clorhídrico (BDGH Chemical, U.S.A.), grado analítico.

- Hidrocloruro de Benzoil L-arginina p-nitroanilida – BApNA, (SIGMA, U.S.A.), grado analítico.
- Dimetil formamida (Riedel Seelze, Alemania), grado analítico.
- Fosfato diácido de sodio (BDGH Chemical, U.K.), 99,8% de pureza.
- Hidróxido de sodio ACS (J.T. Baker, U.K.), 98, 7% de pureza.
- Tripsina en polvo (1:250) (GIBCO™, Invitrogen Corporation, U.S.A.).

2.2.3. EQUIPOS

- Balanza analítica, de 210 g x 0,0001 g (Denver Instrument, U.S.A.).
- Planchas de agitación (VWR Hot plate/stirrer, U.S.A.).
- Centrífuga (ADAMS Analytical Centrifuge, Clay Adams, U.S.A.).
- Centrífuga IEC HN-S (DAMON/IEC DIVISION, U.S.A.).
- Espectrofotómetro U 2000 (Hitachi, U.S.A.).
- pHmetro portátil (Schott Glaswerke Mainz, Alemania).
- pHmetro (Jenway, 3 510 phmeter, U.K.).
- Molino (Corona, Colombia).
- Columna PD-10 (Pharmacia, Suecia).

2.3. PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS DE CHOCHO CON ACTIVIDAD INHIBIDORA SOBRE LA TRIPSINA CON EL USO DE ESPECTROFOTOMETRÍA

2.3.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA TRIPSINA

Se determinó la actividad proteolítica de la tripsina, según el método de Earlander *et al.* (1961) modificado. En la Figura 2.1., se presenta el diagrama detallado del procedimiento que se realizó para determinar la actividad proteolítica de la tripsina sobre BApNA disuelta en dimetil formamida (DMF).

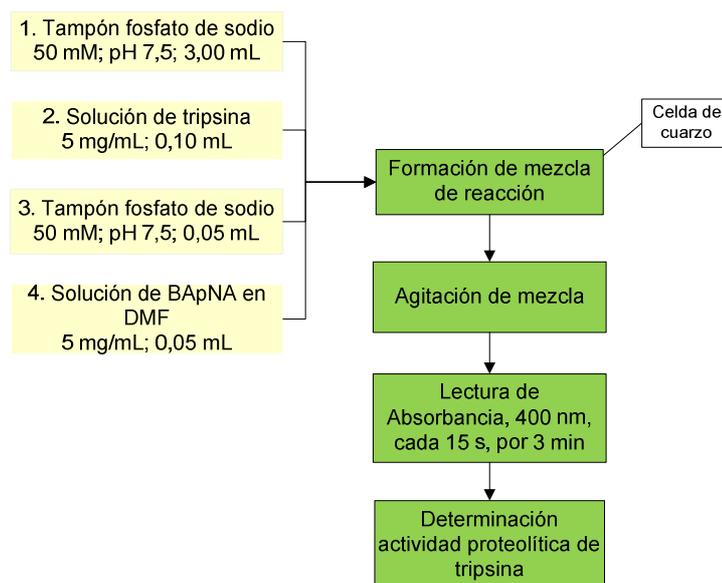


Figura 2.1. Diagrama del proceso para la determinación de la actividad proteolítica de la tripsina con BApNA en DMF como sustrato

La hidrólisis espontánea del sustrato BApNA se determinó según el diagrama de la Figura 2.2.

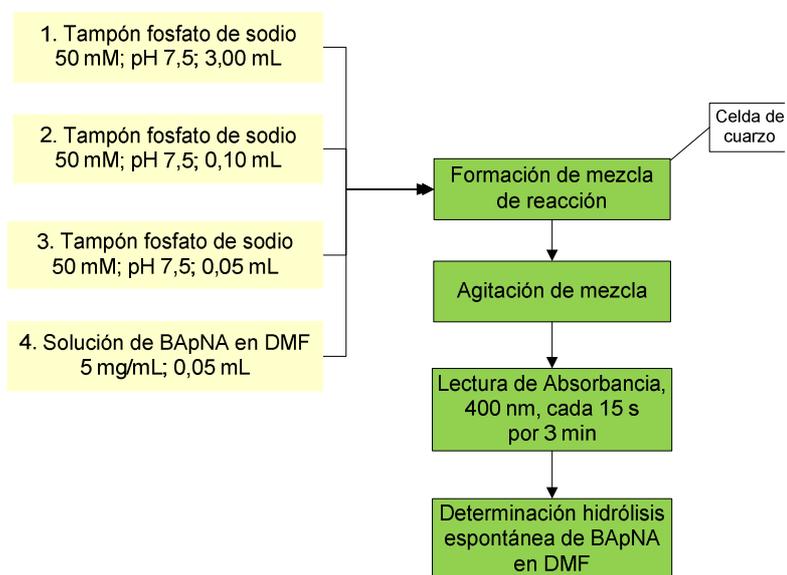


Figura 2.2. Diagrama del proceso para la determinación de la hidrólisis espontánea de BApNA en DMF
Se determinó la actividad proteolítica de la tripsina, en unidades enzimáticas por mililitro de solución de enzima (U/mL), con la ecuación 2.1. (Reina, 2 000).

$$AE = \frac{\Delta DO_{400}}{\Delta t} \times \frac{1000 \times V_c}{\epsilon \times L \times V_e} \quad [2.1]$$

La solución de tripsina se preparó siempre al momento de realizar los ensayos. Un ejemplo de cálculo de la actividad proteolítica de la tripsina se describe en el Anexo A.1.

2.3.2. OBTENCIÓN DE PERMEADO DE CHOCHO

Se obtuvo un extracto de chocho (*L. mutabilis*, var. I-450-Andino) con semillas donadas gentilmente por el Programa de Leguminosas y el Departamento de Producción de Semillas del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Sta. Catalina, Pichincha-Ecuador. Las semillas fueron limpiadas, seleccionadas y almacenadas por el INIAP, por lo que no se hizo ninguna limpieza ni clasificación adicionales. Se realizó el procedimiento que se muestra en el diagrama de la Figura 2.3.

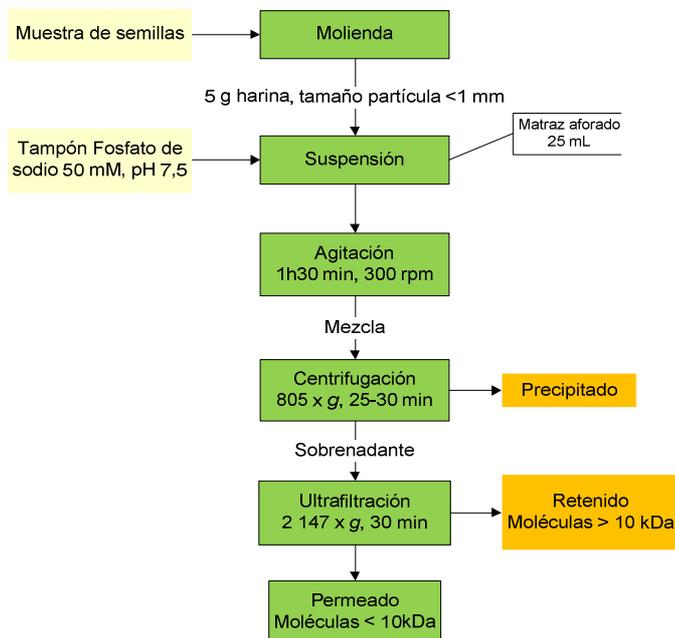


Figura 2.3. Diagrama del procedimiento de obtención del permeado crudo de chocho (*L. mutabilis* var. I-450-Andino)

2.3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE PERMEADO DE CHOCHO

Se calculó la actividad inhibidora como la diferencia de actividad proteolítica de la tripsina en presencia del permeado de chocho y se expresó en unidades enzimáticas por mililitro de extracto inhibidor (U/mL). Se utilizaron tres muestras por variedad, de las cuales se obtuvo un promedio de la actividad inhibidora de la tripsina. Un ejemplo de cálculo se presenta en el Anexo A.2.

Se preparó una mezcla de reacción, según el procedimiento descrito en el acápite 2.3.1., modificado. El procedimiento detallado se observa en la Figura 2.4.

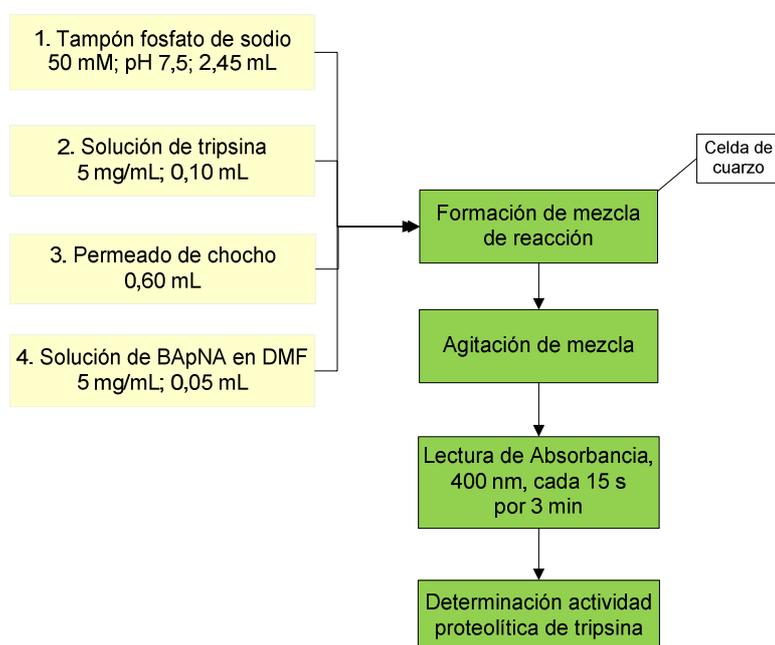


Figura 2.4. Procedimiento para la determinación de la actividad proteolítica de la tripsina con permeado crudo de chocho (*L. mutabilis*, var. I-450-Andino)

Para la preparación del blanco de la actividad de la tripsina con permeado de chocho, se colocó tampón fosfato de sodio en lugar del permeado, como se ve en la Figura 2.5.

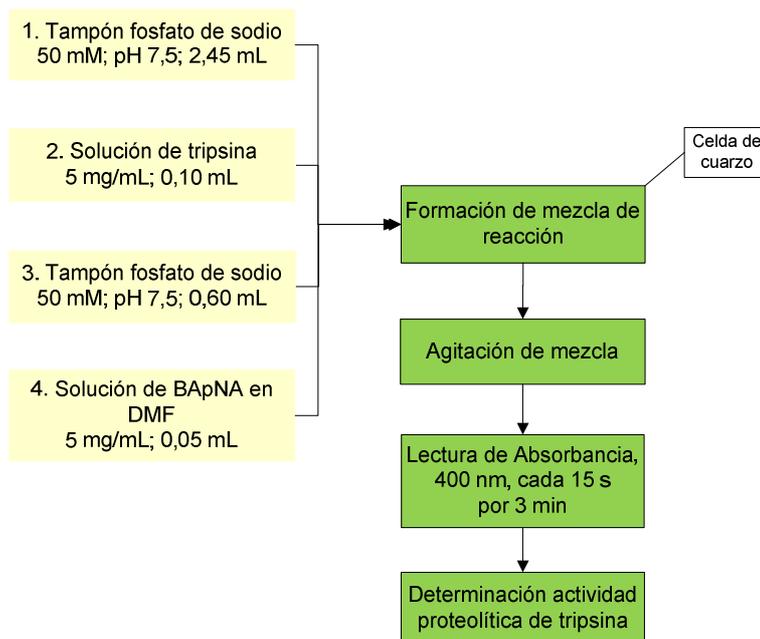


Figura 2.5. Procedimiento para la determinación de la actividad proteolítica de la tripsina sin extracto crudo de chocho (*L. mutabilis*, var. I-450-Andino)

2.4. DETERMINACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO GENERAL DE OBTENCIÓN DE EXTRACTOS INHIBIDORES DE PROTEASAS A PARTIR DE LEGUMINOSAS Y GRAMÍNEAS RECOLECTADAS

Se utilizaron semillas certificadas de leguminosas y gramíneas que procedían de cultivos manejados y controlados técnicamente, que gentilmente donó el Programa de leguminosas y el Departamento de Producción de semillas del INIAP. Las semillas proporcionadas fueron producidas en la Sierra, en Pichincha, Imbabura y Cañar.

Se obtuvieron permeados de las semillas de las diferentes especies y variedades de leguminosas y gramíneas, de acuerdo con el procedimiento descrito en el acápite 2.3.2.

Se realizó una mezcla de harina-tampón (1:5), se agitó durante 1h30 min a 805 × g, se centrifugó por 30 min a 2 147 × g. Esta centrifugación se realizó en dos

partes, primero se centrifugó la mezcla tampón-harina durante 20 min; y, luego, el sobrenadante obtenido, por 10 min adicionales. Se modificó el tiempo de ultrafiltración de 30 a 40 min para obtener la cantidad suficiente del permeado de cada variedad de semilla.

Se determinó la actividad inhibidora de la tripsina de los permeados obtenidos, según lo descrito en el acápite 2.3.3., lo cual se realizó a los siete días de haber preparado cada permeado. Se realizaron tres repeticiones por cada extracto inhibidor y con los resultados de actividad inhibidora de la tripsina y actividad inhibidora específica se realizaron análisis de varianza (ADEVA) y comparación de medias mediante las pruebas de Tukey y T de Student.

2.4.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS PERMEADOS OBTENIDOS

Se determinó la concentración de proteína de los permeados obtenidos con el método de absorción en el UV a 280 nm (Chávez *et al.*, 1990). El procedimiento se describe en el diagrama de la Figura 2.6.

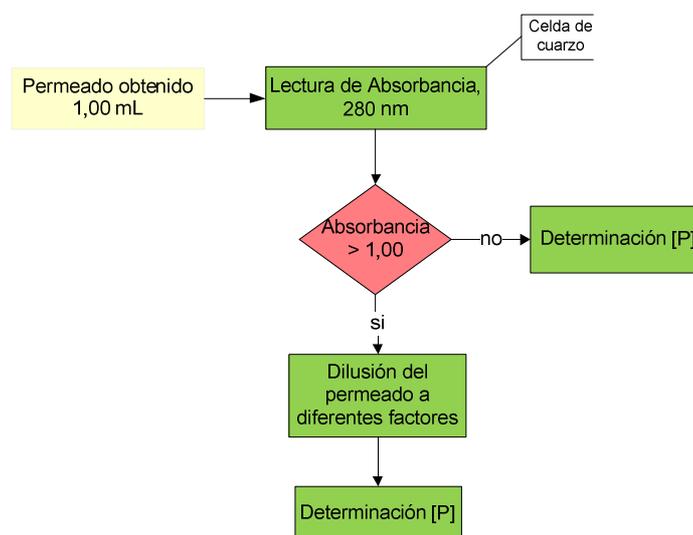


Figura 2.6. Diagrama de procesos para determinar la concentración de proteína

La ecuación 2.2., se utilizó para calcular la concentración de proteína de los extractos. Se tomó un valor arbitrario de $1,0 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el coeficiente de extinción de la proteína a 280 nm.

$$[P] = \frac{DO_{280} \times \left(\frac{f}{L}\right)}{\epsilon} \quad [2.2]$$

2.4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA

El cálculo de la actividad inhibidora específica se realizó mediante la ecuación 2.3 (Chávez *et al.*, 1 990).

$$AI \text{ esp} = \frac{AI}{[P]} \quad [2.3]$$

2.5. PURIFICACIÓN PARCIAL DEL EXTRACTO DE CHOCHO Y DE LOS EXTRACTOS INHIBIDORES MÁS ACTIVOS

Se seleccionaron los 3 permeados que presentaron la mayor actividad inhibidora de la tripsina y se les aplicó 3 diferentes métodos de purificación parcial que fueron: tratamiento térmico con baño maría, precipitación de proteínas con TCA y una combinación de ambos métodos en el mismo permeado.

2.5.1. TRATAMIENTO TÉRMICO

Se realizó la purificación de los 3 permeados preseleccionados y del chocho según el diagrama descrito en la Figura 2.7. Se determinó la actividad inhibidora y la actividad inhibidora específica de los permeados purificados.

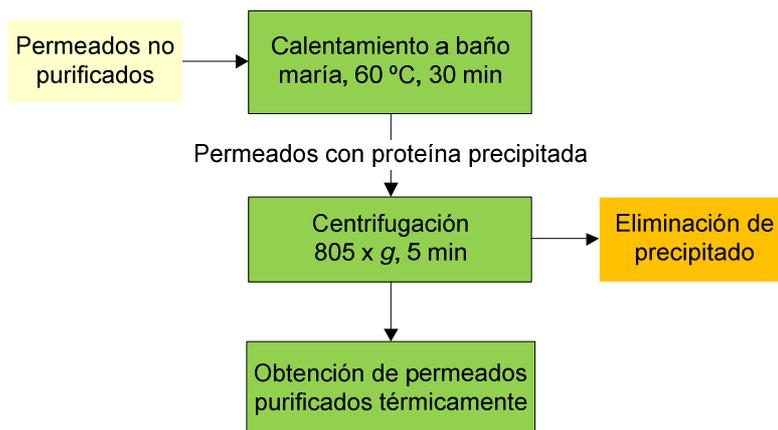


Figura 2.7. Purificación parcial de los permeados preseleccionados y del permeado de chocho con tratamiento térmico

2.5.2. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON TCA

Se realizó la purificación parcial de los permeados preseleccionados y del chocho según el diagrama descrito en la Figura 2.8. (Bonzon, 1 996).

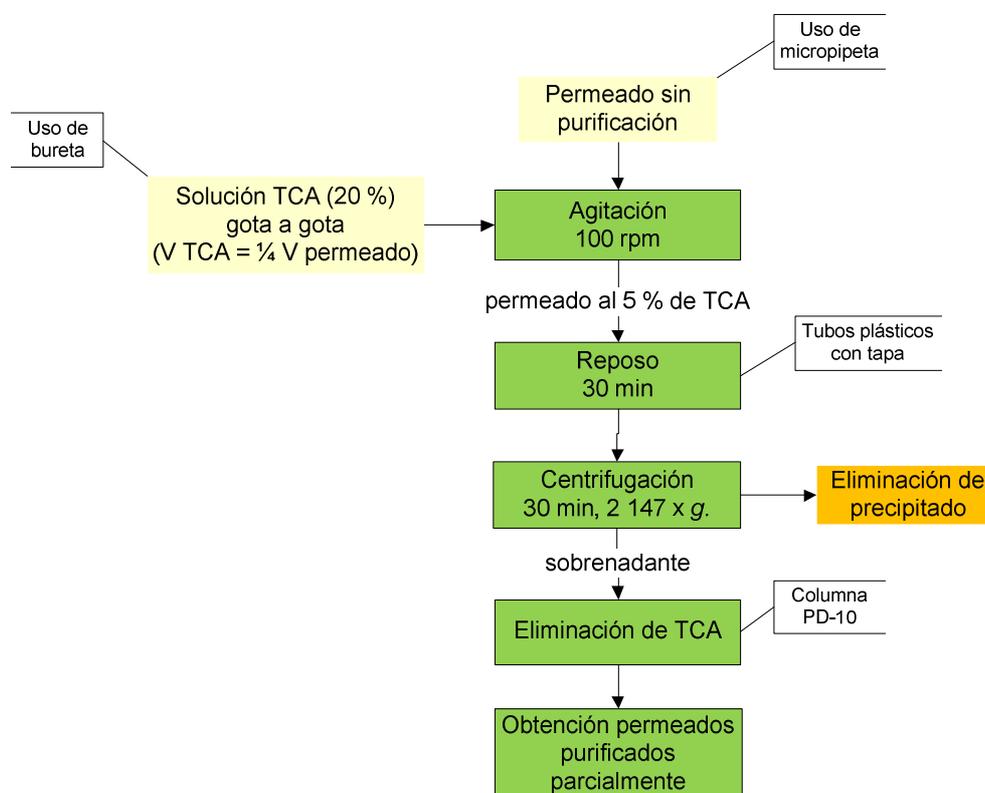


Figura 2.8. Purificación parcial de los permeados preseleccionados y del permeado de chocho con precipitación de proteínas con TCA

Para eliminar el TCA del sobrenadante se realizó una cromatografía de filtración en gel, con una columna PD-10, para lo cual se siguió el siguiente procedimiento:

1. Se lavó la columna con 20,0 mL de tampón fosfato de sodio (50 mM; pH 7,5).
2. Se colocaron 2,5 mL de sobrenadante, en caso de tener una menor cantidad, se colocó la cantidad que se poseía y luego se añadió el tampón fosfato de sodio hasta completar el volumen de 2,5 mL.
3. Se colocaron 3,5 mL de tampón. Si se colocó menos de 2,5 mL de sobrenadante, el volumen de tampón fue igual al producto de la cantidad de sobrenadante colocado por 1,5.
4. Se colectó el volumen eluido después de añadir el tampón, al cual se lo denominó "fracción 1" y se determinó su actividad inhibidora de la tripsina y su actividad inhibidora específica.
5. Por último, se añadieron 20,0 mL de tampón fosfato de sodio y se colectó el volumen eluido en cuatro fracciones de 5,0 mL cada una, en las cuales, se determinó la actividad inhibidora de la tripsina y la actividad inhibidora específica. Se escogieron los primeros 5,0 mL (fracción 2) que se eluyeron después de este paso porque presentaron la mayor actividad inhibidora.

2.5.3. APLICACIÓN DE TRATAMIENTO TÉRMICO Y TCA

Los permeados crudos se sometieron primeramente a un tratamiento térmico en baño maría, según el procedimiento descrito en el acápite 2.5.1. Seguido de esto, se aplicó el método de precipitación de proteínas con TCA según lo descrito en el acápite 2.5.2.

2.5.4. ACTIVIDAD INHIBIDORA Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE LOS RETENIDOS DE LA ESPECIE SELECCIONADA Y DEL CHOCHO

Se seleccionó el permeado que presentó la mayor actividad inhibidora y se analizó la presencia de esta actividad en el retenido de esta especie y también en el retenido de chocho, según lo descrito en el acápite 2.3.3. Previamente, se eliminaron las partículas grandes existentes en los retenidos. En la Figura 2.9. se presenta un diagrama para la obtención de una solución de retenido, apta para la determinación de actividad inhibidora de la tripsina y actividad inhibidora específica.

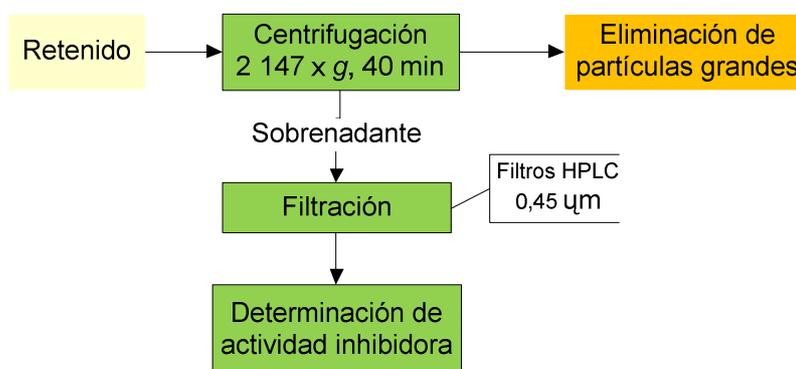


Figura 2.9. Eliminación de partículas grandes del retenido de la especie seleccionada y del chocho para la determinación de la actividad inhibidora de la tripsina

También se realizó la purificación parcial del sobrenadante obtenido del retenido, tanto de la especie seleccionada como del chocho, con el uso de los tres métodos de purificación parcial descritos en el acápite 2.5. Se obtuvo la actividad inhibidora y actividad inhibidora específica después de aplicar cada método. Se usó un retenido diferente para cada purificación.

2.6. EVALUACIÓN DE LOS PROCESOS DE PURIFICACIÓN

Se evaluaron los procesos de purificación parcial de los permeados preseleccionados y del chocho con el uso de las ecuaciones 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4; descritas en el acápite 1.4.3.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA INHIBICIÓN DE TRIPSINA CON PERMEADO DE CHOCHO (*L. mutabilis*, var. I-450-Andino)

3.1.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA TRIPSINA

La actividad proteolítica (AE) y la actividad proteolítica específica (AE esp) de la tripsina, sobre BApNA, que se obtuvieron según los métodos descritos en los acápites 2.3.1. y 2.4.2., se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Actividad proteolítica de la tripsina sobre BApNA disuelto en DMF

Nº ensayo	AE (mU/mL)	AE esp (mU/mg)
1	413,82	82,76
2	383,15	76,63
3	451,27	90,26
4	387,00	77,40
5	425,00	85,00
6	491,76	98,35
7	438,06	87,61
8	448,00	89,60
9	420,36	84,07
10	465,33	93,07
Promedio	432,38± 33,78	86,48± 6,76

La actividad proteolítica de la tripsina estuvo comprendida entre 383,15 y 491,76 mU/mL. El valor promedio fue de 432,38 ± 33,78 mU/mL, es decir, con un 7,81 % de variación. De igual manera, la actividad proteolítica específica de la tripsina fluctuó entre 76,63 y 98,35 mU/mg, el valor promedio fue de 86,48 ± 6,76 mU/mg, es decir, con una variación de 7,82 %. Estas variaciones se deberían a que la actividad de toda solución de enzima depende de factores externos como la

temperatura ambiente a la que se está utilizando, el manejo, la conservación, entre otros.

Debido a la variación de actividad que presentó la tripsina, su valor fue medido previamente, al inicio del estudio de cada extracto inhibidor ensayado.

El primer extracto inhibidor se obtuvo a partir de semillas de chocho (*Lupinus mutabilis*), una materia prima estudiada con anterioridad (Schoeneberger *et al.*, 1 981; Glencross, 2 001; Khalil *et al.*, 2 006).

3.1.2. ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA TRIPSINA DEL PERMEADO DE CHOCHO

La actividad inhibidora del permeado de chocho fue de $28,50 \pm 0,73$ mU/mL, con lo que la actividad proteolítica de la tripsina disminuyó un 6,70 %. Este porcentaje de inhibición es igual al reportado por Gómez *et al.* (1 998) para semillas de chontaduro (*Bractis gasipaes*), las cuales poseen entre sus componentes más relevantes a las grasas, semejanza que comparte con el chocho, aunque los métodos de extracción para estas dos especies fueron diferentes.

La actividad inhibidora del permeado de chocho también es igual a $2,85 \pm 0,73$ UIT (Unidades Inhibidas de Tripsina)/mL, según el método de Kakade *et al.* (1 974). Este valor es 2,46 veces mayor que el encontrado en un ecotipo de esta especie (1,16 UIT/mL) y reportado en el estudio de Schoeneberger *et al.* (1 981). En ese estudio indican que esta actividad fue muy baja en comparación con la actividad inhibidora de la soya (30,10 UIT/mL) y que no encontraron actividad inhibidora de tripsina en algunos ecotipos de *L. mutabilis*.

Las diferencias de actividad inhibidora reportadas para el chocho, puede ser porque el método de extracción fue diferente al ensayado en este trabajo, ya que utilizaron procesos de hervido de las semillas crudas, desamargado de las semillas cocidas con tres horas de remojo en agua y molido de estas para obtener una torta oleaginosas que fue desengrasada con etanol; esto pudo provocar la

desnaturalización y eliminación de la actividad inhibidora de la tripsina, la cual también depende de las diferentes variedades genéticas que se utilicen (Schoeneberger *et al.*, 1981).

3.1.3. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA DEL PERMEADO DE CHOCHO

La concentración de proteína del permeado de chocho fue de 34,20 mg/mL o igual a 0,12 g. También se estimó que en el permeado de chocho (34 % del volumen total del extracto de semillas de chocho) existió una cantidad de proteína de 0,18 g de proteína/g de harina de chocho, este valor concuerda con el 36 % del valor obtenido por Rodríguez (2009) (0,50 g de proteína/g de harina de chocho), es decir, que el extracto total de semillas de chocho pudo tener un valor de proteína similar al reportado por el mencionado autor.

La actividad inhibidora específica del permeado de chocho fue de $0,833 \pm 0,021$ mU/mg o según el método de Kakade *et al.* (1969), igual a $0,083 \pm 0,021$ UIT/mg de proteína. Rekha *et al.* (2008) reportaron valores de actividad inhibidora de la tripsina para extractos de harina de semillas desengrasadas de garbanzo (*C. arietinum*) de la variedad Pusa pragati, igual a $6,190 \pm 0,560$ UIT/mg de proteína; para lo cual, utilizaron un método de extracción diferente al utilizado en este ensayo, por lo que pudieron obtener un extracto crudo más purificado que el de este estudio.

Luego de haber obtenido la actividad inhibidora y la actividad inhibidora específica de la tripsina con el permeado de chocho, se procedió a elaborar permeados de diferentes especies y variedades de semillas de leguminosas y gramíneas.

3.2. ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA TRIPSINA DEL PERMEADOS DE SEMILLAS DE LEGUMINOSAS Y GRAMÍNEAS

Según el procedimiento general descrito en el acápite 2.4., se obtuvieron permeados de las semillas de algunas especies de leguminosas y gramíneas provistas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.

3.2.1. ACTIVIDAD INHIBIDORA DEL PERMEADOS DE LEGUMINOSAS

Se obtuvo actividad inhibidora de la tripsina (AI) de los permeados de semillas de leguminosas, según el procedimiento descrito en el acápite 2.3.3. Los resultados se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados de semillas de leguminosas

#	Especies	Variedades	AE (mU/mL)	AI (mU/mL)
1	<i>Fréjol (Phaseolus vulgaris)</i>	I-420-Canario del chota	413,82 ± 4,00	4,86 ^{EF} ± 0,35
2		I-424-Concepción	413,09 ± 4,81	11,68 ^C ± 0,64
3		I-406-Guarandeño	383,15 ± 5,02	12,91 ^C ± 1,07
4		I-427-Libertador	447,67 ± 6,61	15,49 ^{AB} ± 0,93
5		I-414-Yunguilla	447,67 ± 6,61	17,56^A ± 0,81
6		Paragachi Andino	413,82 ± 4,00	12,05 ^C ± 1,18
7		I-412-TOA	413,82 ± 4,00	13,86 ^{BC} ± 1,23
8		I-418-Je. Ma	387,00 ± 1,73	12,89 ^C ± 0,54
9		I-425-Blanco Fanesquero	425,00 ± 5,00	11,67 ^C ± 0,83
10	<i>Arveja (Pisum sativum)</i>	I-433-Roxana	387,00 ± 1,73	4,28 ^{EF} ± 0,26
11		I-432-Lojanita	448,00 ± 7,16	13,37 ^{BC} ± 0,35
12		I-434-Esmeralda	413,09 ± 4,81	3,46^F ± 0,18
13	<i>Haba (Vicia faba)</i>	I-441-Serrana	413,09 ± 4,81	12,63 ^C ± 0,31
14		I-440-Quitumbe	416,55 ± 1,55	8,92 ^D ± 0,49
15		Chaucha	425,00 ± 5,00	13,17 ^C ± 1,04
16	<i>Lenteja (Lentis culinaris)</i>	I-406	448,00 ± 7,16	6,44 ^E ± 0,34

Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

El permeado crudo de fréjol, variedad I-414-Yunguilla, presentó el mayor valor de actividad inhibidora de la tripsina a pesar de que no presentó diferencias significativas con el extracto de semillas de fréjol variedad I-427 Libertador, pero tuvo diferencias significativas con las demás actividades obtenidas. Su valor es 38,39 % menor que la actividad inhibidora del permeado crudo de chocho ($28,50 \pm 0,73$ mU/mL) y equivale al 3,92 % de inhibición. Seidl *et al.* (1969) encontraron un porcentaje de inhibición del 30,00 % con el extracto crudo de fréjol negro (*P. vulgaris*), variedad Cubagua, el cual lo obtuvieron a diferentes condiciones de extracción que no estuvieron a nuestro alcance, por lo que pudieron obtener un extracto crudo más purificado que los permeados crudos presentados en este ensayo.

El permeado crudo de arveja, variedad I-434-Esmeralda, presentó la menor actividad inhibidora, la cual es 87,86 % menor que la actividad inhibidora del permeado crudo de chocho.

3.2.2. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA DE LOS PERMEADOS DE LEGUMINOSAS

En la Tabla 3.3., se presentan los resultados de concentración de proteína y actividad inhibidora específica obtenidos según los métodos descritos en los acápites 2.4.1. y 2.4.2.

Tabla 3.3. Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados de semillas de leguminosas

#	Especies	Variedades	[P] (mg/mL)	AI esp (mU/mg)
1	Fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	I-420-Canario del chota	29,66	0,164 ^H ± 0,012
2		I-424-Concepción	12,08	0,967 ^{BCD} ± 0,053
3		I-406-Guarandeño	18,02	0,717 ^F ± 0,060
4		I-427-Libertador	14,06	1,102 ^B ± 0,066
5		I-414-Yunguilla	13,41	1,309^A ± 0,060
6		Paragachi Andino	14,4	0,837 ^{EF} ± 0,082
7		I-412-TOA	13,4	1,034 ^{BC} ± 0,092
8		I-418-Je. Ma	14,24	0,905 ^{CDE} ± 0,038
9		I-425-Blanco Fanesquero	13,77	0,847 ^{DEF} ± 0,061
10	Arveja (<i>Pisum sativum</i>)	I-433-Roxana	12,57	0,340 ^G ± 0,020
11		I-432-Lojanita	10,69	1,251 ^A ± 0,033
12		I-434-Esmeralda	10,76	0,322 ^G ± 0,016
13	Haba (<i>Vicia faba</i>)	I-441-Serrana	98,48	0,128 ^H ± 0,003
14		I-440-Quitumbe	93,68	0,095^H ± 0,005
15		Chaucha	130,62	0,101 ^H ± 0,008
16	Lenteja (<i>Lentis culinaris</i>)	I-406	14,66	0,440 ^G ± 0,023

Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

El permeado crudo de fréjol, variedad I-414-Yunguilla, presentó el mayor valor de actividad inhibidora específica, igual a $1,309 \pm 0,060$ mU/mg, aunque estadísticamente no presentó diferencias significativas con el valor de actividad inhibidora específica del permeado crudo de arveja variedad I-432-Lojanita. Este valor es mayor que del permeado crudo de chocho ($0,833 \pm 0,021$ mU/mg) en un 36,36 %, debido a que el permeado de fréjol tuvo un 60,79 % menos de concentración proteica (13,41 mg/mL) que el de chocho (34,20 mg/mL). Esto significa que la actividad específica del fréjol fue mayor que la del permeado crudo de chocho debido al menor contenido de proteína, aunque su actividad inhibidora haya sido menor.

Según el método de Kakade *et al.* (1974), la actividad inhibidora específica del permeado crudo de fréjol I-414-Yunguilla sería de $0,131 \pm 0,060$ UTI/mg. Zamora

(2 003), obtuvo actividad inhibidora de la tripsina de semillas de la leguminosa *Canavalia ensiformis*, igual a $27,490 \pm 0,220$ UTI/mg, pero utilizó un método de extracción diferente al de este ensayo, en condiciones que no estuvieron a nuestro alcance, por lo que no se puede comparar el grado de pureza entre los extractos de estas dos especies.

El permeado crudo que presentó el menor valor de actividad inhibidora específica es el de haba, variedad I-440-Quitumbe, con $0,095 \pm 0,005$ mU/mg; pero no presentó diferencias estadísticamente significativas con las actividades inhibidoras específicas de los permeados crudos de haba variedad I-441-Serrana y Chaucha, y de fréjol variedad I-420-Canario del Chota; debido a sus altas concentraciones de proteína y en el caso del permeado crudo de la variedad de fréjol mencionada, se debe a su baja actividad inhibidora.

Los permeados crudos presentaron altas concentraciones de proteína, a pesar de que en ellos se encontraban moléculas menores a 10 kDa, según Barreto y Monteghirfo (1 995), las leguminosas poseen mayor cantidad de proteínas de alto peso molecular como las albúminas y las globulinas.

La actividad inhibidora específica fue utilizada solo como referencia para el control de la purificación de los permeados que se realizó posteriormente, debido a que en la determinación de la concentración proteica se tomaron en cuenta algunos factores influyentes como la turbidez, el color de los permeados u otras proteínas existentes (Yáñez, 2 006).

En el caso del color de los permeados, a simple vista presentaron coloración verde o amarillo claro; pero fueron transparentes y hubo baja presencia de turbidez. Por otro lado, en los permeados analizados, pudo haber otras proteínas de bajo peso molecular como las prolaminas. Según Gallegos *et al.* (2 004), estas proteínas poseen pesos moleculares menores a 10 kDa y las detectaron en su estudio de proteínas de *Phaseolus lunatus*, las cuales se pueden encontrar también en otras leguminosas.

3.2.3. ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LOS PERMEADOS DE GRAMÍNEAS

En la Tabla 3.4., se presentan los resultados de actividad inhibidora de la tripsina obtenidos de los permeados de semillas de gramíneas, según lo descrito en el acápite 2.3.3.

Tabla 3.4. Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados de semillas de gramíneas

#	Especies	Variedades	AE (mU/mL)	AI (mU/mL)
1	Trigo (<i>Triticum</i>)	INIAP-Cojitambo	425,00 ± 5,00	5,94 ^C ± 0,51
2	Maíz (<i>Zea mays</i>)	I-122	413,82 ± 4,00	5,05^C ± 0,22
3	Centeno (<i>Secale cereale</i>)	Línea	383,15 ± 5,02	11,64 ^B ± 0,25
4	Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	INIAP-Cañicapa	383,15 ± 5,02	21,53^A ± 2,91

Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

En la Tabla 3.4., se observa que el permeado crudo de cebada presentó la mayor actividad inhibidora. Este valor fue semejante al valor de actividad inhibidora obtenido con el permeado crudo de chocho, con un porcentaje de diferencia del 4,59 %.

El permeado crudo que presentó menor actividad inhibidora es el de maíz y no presentó diferencias estadísticamente significativas con el permeado de trigo. Este valor de actividad es menor en un 82,28 % con respecto al valor de actividad inhibidora del permeado crudo de chocho.

Martínez y Alarcón (1 998) usaron soluciones de gluten de maíz y obtuvieron un porcentaje de inhibición mayor al 20,00 % sobre la actividad de proteasas de extractos de peces (*O. niloticus*), pero con extractos de otras especies de peces (*S. senegalensis* y *S. aurata*) hubo baja inhibición. También reportaron porcentajes de inhibición de hasta el 40,00 % con soluciones de salvado de trigo sobre la actividad proteásica de los extractos de peces indicadas anteriormente. Este porcentaje es mayor que el porcentaje de inhibición obtenido en este ensayo (1,40 %) con el permeado crudo de trigo.

Los mayores porcentajes de inhibición reportados, puede deberse a que los autores citados utilizaron diferentes métodos de extracción y determinación de la actividad inhibidora, además de que no usaron las semillas enteras de trigo y maíz. La actividad inhibidora que obtuvieron no solo es sobre la tripsina, sino también sobre otras proteasas existentes en los extractos de páncreas y duodeno de esos peces, por lo que no son resultados comparables. Esto podría significar, que las semillas de trigo y maíz pueden tener una mayor actividad inhibidora sobre otras proteasas diferentes a la tripsina.

3.2.4. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA DE LOS PERMEADOS DE GRAMÍNEAS

En la Tabla 3.5., se presentan los resultados de actividad inhibidora específica y concentración de proteína de los permeados de las semillas de gramíneas.

Tabla 3.5. Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de permeados de semillas de gramíneas

#	Especies	Variedades	[P] (mg/mL)	AI esp (mU/mg)
1	Trigo (<i>Triticum</i>)	INIAP-Cojitamba	8,65	0,687 ^B ± 0,059
2	Maíz (<i>Zea mays</i>)	I-122	7,77	0,650^B ± 0,028
3	Centeno (<i>Secale cereale</i>)	Línea	16,44	0,708 ^B ± 0,015
4	Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	INIAP-Cañicapa	11,51	1,870^A ± 0,250

Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

El permeado crudo de cebada presentó la mayor actividad inhibidora específica, igual a $1,870 \pm 0,250$ mU/mg y tuvo diferencias estadísticas significativas con las actividades específicas de los permeados crudos de las otras especies de gramíneas; en comparación con la actividad específica del permeado crudo de chocho, el valor de actividad específica del permeado crudo de cebada es un 64,73 % mayor.

El menor valor de actividad específica fue del permeado crudo de maíz, igual a $0,650 \pm 0,028$ mU/mg, aunque no presentó estadísticamente diferencias

significativas con los permeados crudos de trigo y centeno, ni tampoco hubo diferencias significativas entre estos dos permeados ni con el permeado crudo de chocho.

Carabaño y Fraga (1 992) presentaron una tabla con valores de actividad inhibidora específica de la tripsina recopilados de varios autores, en donde la mayor actividad específica es de la cebada y la menor actividad es del maíz; esta relación de mayor y menor actividad específica coincide con los resultados reportados en este estudio para los permeados crudos de maíz y cebada.

Las gramíneas poseen una alta concentración de prolaminas con respecto a las albúminas y a las globulinas, a diferencia de las leguminosas (Barreto y Monteghirfo, 1 995). Por lo tanto, los resultados obtenidos de concentración de proteína y de actividad inhibidora específica dependen de la presencia de otras moléculas proteicas y factores como la turbidez, que influyen en la determinación de estos resultados, por lo que se tomaron solo como referencia para el control de la purificación de los inhibidores de tripsina de los permeados.

3.3. SELECCIÓN DE TRES PERMEADOS CON MAYOR ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA TRIPSINA

Se seleccionaron los permeados crudos de semillas de leguminosas y gramíneas que presentaron la mayor actividad inhibidora de la tripsina y que pertenecieron a diferentes especies y variedades, a más del permeado crudo de chocho. Los permeados preseleccionados y sus actividades inhibidoras se encuentran resumidos en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Permeados crudos preseleccionados por su mayor actividad inhibidora de la tripsina

Especies	Variedades	AI (mU/mL)	AI esp (mU/mg)
Arveja (<i>P. sativum</i>)	I-432-Lojanita	13,37 ± 0,35	1,251 ± 0,033
Fréjol (<i>P. vulgaris</i>)	I-414-Yunguilla	17,56 ± 0,81	1,309 ± 0,060
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	INIAP-Cañicapa	21,53 ± 0,72	1,870 ± 0,021

La Figura 3.1. muestra las actividades inhibidoras de los permeados preseleccionados y del permeado del chocho.

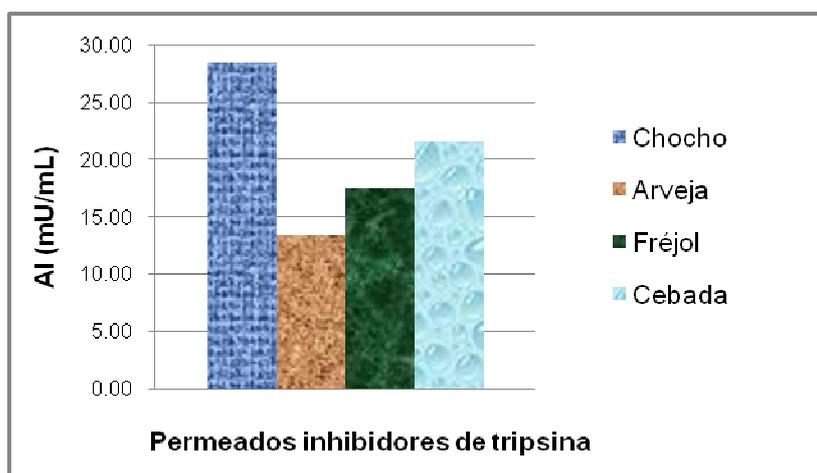


Figura 3.1. Actividad inhibidora de la tripsina de los tres permeados crudos preseleccionados y el permeado crudo de chocho

3.4. PURIFICACIÓN PARCIAL DEL PERMEADO DE CHOCHO Y DE LOS TRES PERMEADOS PRESELECCIONADOS

Se realizó la purificación parcial del permeado de chocho y de los permeados preseleccionados, con el uso de tratamiento térmico en baño maría, precipitación de proteínas con TCA y una combinación de ambos métodos.

Se utilizaron estos métodos de purificación para eliminar las proteínas que no fueron de interés, a través de su desnaturalización y precipitación y por las

diferentes características que presentan los inhibidores de proteasas con respecto a las demás proteínas.

3.4.1. TRATAMIENTO TÉRMICO CON BAÑO MARÍA

Se realizó el tratamiento térmico de los permeados de chocho y de las especies preseleccionadas de acuerdo con el método descrito en el acápite 2.5.1.

3.4.1.1. Actividad inhibidora de los permeados purificados con tratamiento térmico

La actividad inhibidora de la tripsina de los permeados purificados con tratamiento térmico, se muestran en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados purificados parcialmente con tratamiento térmico

Especie	Variedades	AI (mU/mL)
Chocho (<i>L. mutabilis</i>)	I-450-Andino	23,28 ^A ± 0,89
Arveja (<i>P. sativum</i>)	I-432-Lojanita	6,99^B ± 0,15
Fréjol (<i>P. vulgaris</i>)	I-414-Yunguilla	22,01^A ± 1,41
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	INIAP-Cañicapa	7,65 ^B ± 0,46

Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

El permeado de fréjol purificado térmicamente presentó la mayor actividad inhibidora; mientras que, el permeado de arveja purificado térmicamente presentó la menor actividad inhibidora. Entre estos dos permeados existe una diferencia de actividad del 68,99 %.

Las actividades inhibidoras del permeado de fréjol y del permeado de chocho purificados térmicamente, no poseen diferencias estadísticamente significativas. En cambio, la actividad inhibidora del permeado de arveja y cebada purificados

térmicamente variaron significativamente con respecto al permeado de chocho y fueron un 69,94 y 67,14 % menores, respectivamente.

Las actividades inhibitoras de los permeados de arveja y cebada purificados térmicamente, no presentaron diferencias significativas.

En el estudio de Brenes y Brenes (1993), se establece que la termolabilidad o inactivación de los inhibidores de tripsina dependen de la especie que se analice, pues no todas poseen las mismas clases de inhibidores, así como del método que se utilice para la desnaturación de las proteínas no deseadas; también depende de la variedad de la especie a tratar, lo cual comprobaron con diferentes cultivares de arveja (*P. sativum*).

En la Tabla 3.8., se observan las actividades obtenidas antes y después de la aplicación del método de tratamiento térmico en los permeados crudos preseleccionados y de chocho.

Tabla 3.8. Actividades inhibitoras de los permeados crudos y purificados térmicamente

Especies	Variedades	AI (mU/mL) Permeados crudos	AI (mU/mL) Permeados purificados térmicamente
Chocho (<i>L. mutabilis</i>)	I-450-Andino	28,50 ^A ± 0,73	23,28 ^B ± 0,89
Arveja (<i>P. sativum</i>)	I-432-Lojanita	13,37 ^A ± 0,35	6,99 ^B ± 0,15
Fréjol (<i>P. vulgaris</i>)	I-414-Yunguilla	17,56 ^A ± 0,81	22,01 ^A ± 1,41
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	INIAP-Cañicapa	21,53 ^A ± 0,72	7,65 ^B ± 0,46

Las letras diferentes entre las actividades inhibitoras de permeados crudos y purificados térmicamente indican diferencias estadísticas significativas (T de Student, $\alpha=0,05$)

La purificación con calor disminuyó las actividades inhibitoras de los permeados purificados térmicamente de chocho en 18,31 %; de arveja en 47,72 % y de cebada en 73,08 %; mientras que en el permeado de fréjol purificado térmicamente, esta actividad aumentó en un 20,22 %, aunque no presentó diferencias estadísticas significativas. Este aumento de actividad pudo deberse a

que precipitaron moléculas de inhibidores o complejos proteicos formados por los inhibidores con otras moléculas. Todos los demás permeados purificados térmicamente presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a sus respectivos permeados crudos.

En la Figura 3.2., se observa la mayor actividad inhibidora obtenida por el permeado de fréjol purificado térmicamente con respecto a las actividades inhibidoras obtenidas con los demás permeados purificados, pero es similar a la actividad inhibidora del permeado de chocho purificado térmicamente.

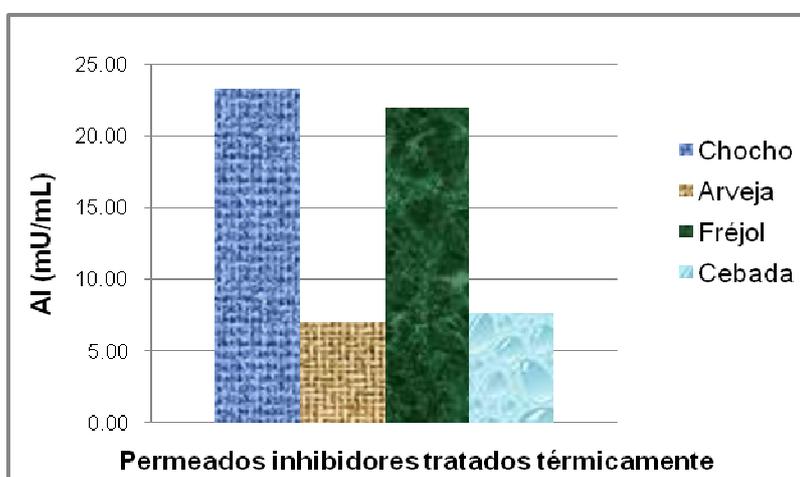


Figura 3.2. Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados purificados con tratamiento térmico

3.4.1.2. Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados purificados con tratamiento térmico

La concentración de proteína y la actividad inhibidora específica de los permeados purificados con tratamiento térmico, se muestran en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados purificados parcialmente con tratamiento térmico

Especie	Variedades	[P] (mg/mL)	AI esp (mU/mg)
Chocho (<i>L. mutabilis</i>)	I-450 Andino	34,95	0,666 ^C ± 0,026
Arveja (<i>P. sativum</i>)	I-432-Lojanita	7,59	0,921 ^B ± 0,020
Fréjol (<i>P. vulgaris</i>)	I-414 Yunguilla	9,58	2,297^A ± 0,147
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	INIAP-Cañicapa	8,68	0,881^B ± 0,052

Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

La mayor actividad inhibidora específica se presentó en el permeado de fréjol purificado térmicamente y presentó diferencias estadísticamente significativas con las actividades específicas de los otros permeados purificados térmicamente, mientras que el menor valor de actividad específica fue del permeado de cebada purificado térmicamente; ya que, estadísticamente no presentó diferencias significativas con el permeado de arveja purificado térmicamente.

Las concentraciones de proteína de los permeados de fréjol y cebada purificados térmicamente, se diferencian en un 9,40 %, mientras que sus actividades específicas se diferencian en un 65,52 %. Esto indicaría que la relación entre la concentración de proteína y la actividad inhibidora no es proporcional y que los inhibidores presentes en el permeado de fréjol pueden tener mayor especificidad, por la tripsina, que los presentes en el permeado de cebada.

Las actividades específicas de los permeados tratados térmicamente de fréjol y cebada son 72,66 y 21,09 % mayores, con respecto a la del permeado de chocho (0,666± 0,026 mU/mg) tratado térmicamente, respectivamente.

La concentración de proteína del permeado de chocho después del tratamiento térmico (34,95 mg/mL) no presentó diferencias significativas con respecto a la de su permeado crudo (34,20 mg/mL), como sí sucedió con los demás permeados purificados térmicamente. En el Anexo B se presenta la Tabla B.1., en donde se comparan los promedios de las concentraciones de los permeados crudos y purificados térmicamente.

La estabilidad de la proteína del permeado de chocho depende de las proteínas que se sometieron al método térmico, del método utilizado, de la fuerza iónica presente en el medio, de la sal utilizada como tampón y de la concentración de esta. Si la fuerza iónica es baja, la estabilidad de las estructuras proteicas se debe a interacciones electrostáticas (Avanza y Añón, 2 006). En el caso de los permeados analizados, la fuerza iónica es baja porque la concentración del fosfato de sodio (50 mM) que se usó como tampón es baja, a pesar de que es una sal multivalente y que ejerce mayor fuerza iónica que una sal monovalente, el efecto de apantallamiento que da esta sal sobre las interacciones electrostáticas no es tan fuerte como para dejar a las proteínas sin hidratación, por lo que estas se mantienen solubles.

La temperatura de calentamiento tampoco disminuyó la solubilidad de las proteínas, sino más bien, pudo haber un ligero aumento de la exposición de aminoácidos aromáticos, que pudo deberse a alteraciones de sus estructuras conformacionales (Avanza y Añón, 2 006).

En la Figura 3.3., se presentan las actividades inhibitoras específicas obtenidas después de ser tratados con el método de tratamiento térmico

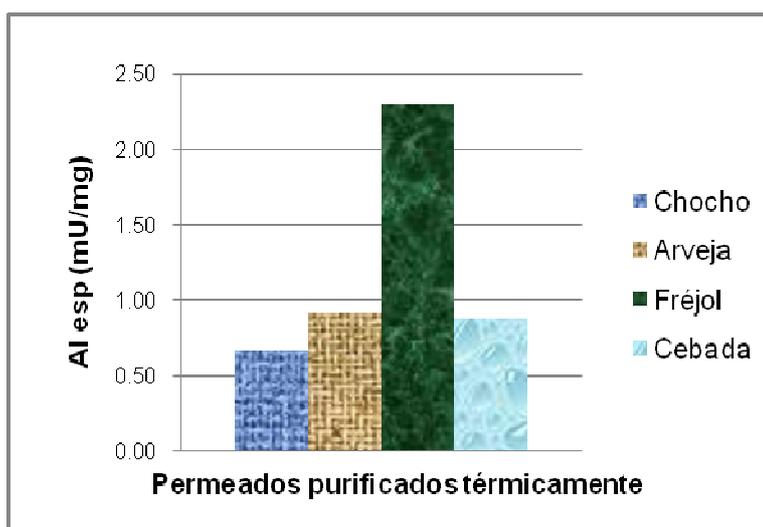


Figura 3.3. Actividad inhibitora específica de los permeados purificados térmicamente

En la Tabla 3.10., se presentan las actividades específicas de los permeados crudos y purificados térmicamente

Tabla 3.10. Actividades inhibitoras específicas de los permeados crudos y purificados térmicamente

Especies	Varietades	AI esp (mU/mg) Permeados crudos	AI esp (mU/mg) Permeados purificados térmicamente
Chocho (<i>L. mutabilis</i>)	I-450-Andino	0,833 ^A ± 0,021	0,666 ^B ± 0,026
Arveja (<i>P. sativum</i>)	I-432-Lojanita	1,251 ^A ± 0,033	0,921 ^B ± 0,020
Fréjol (<i>P. vulgaris</i>)	I-414-Yunguilla	1,309 ^A ± 0,060	2,297 ^B ± 0,147
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	INIAP-Cañicapa	1,870 ^A ± 0,021	0,881 ^B ± 0,052

Las letras diferentes entre las actividades inhibitora específica de permeados crudos y purificados térmicamente indican diferencias estadísticas significativas (T de Student, $\alpha=0,05$)

Las actividades específicas de los permeados purificados térmicamente, en relación con las obtenidas por los permeados crudos, fueron menores para el de chocho, en un 20,05 %; para el de arveja, en un 26,30 %; y, para el de cebada, en un 64,27 %; pero, el permeado de fréjol purificado térmicamente presentó una actividad específica mayor, en un 43,01 %. Lo cual indicaría que se lograron purificar las moléculas de inhibidores y eliminar otras proteínas presentes en este permeado.

Se compararon estadísticamente los promedios de las actividades inhibitoras específicas de los permeados crudos y de los permeados purificados térmicamente y se observa que en todos los casos existen diferencias estadísticamente significativas.

Los tipos de inhibidores presentes en los permeados de chocho, arveja y sobre todo de cebada presentaron termolabilidad al tratamiento térmico aplicado. Esto se reflejó en la disminución de la actividad inhibitora obtenida por cantidad de proteína presente en cada permeado purificado.

3.4.2. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON TCA

Se realizó la precipitación de proteínas con TCA de acuerdo con el método descrito en el acápite 2.5.2. Se determinó la actividad inhibidora y la actividad inhibidora específica de cada permeado purificado con TCA, representado por la fracción número 2 de un total de 5 fracciones eluidas de la columna PD-10, de la cromatografía realizada, según el acápite 2.5.2.

La presencia de actividad inhibidora en la fracción número 2, indica que los inhibidores de la tripsina poseen pesos moleculares mayores a 5 kDa, según los límites de exclusión de la columna y menores a 10 kDa, debido a la selectividad de la ultrafiltración.

3.4.2.1. Actividad inhibidora de los permeados purificados con precipitación de proteínas con TCA

Los resultados de actividad inhibidora de la tripsina obtenidos con los permeados purificados por precipitación de proteínas con TCA, se presentan en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados purificados parcialmente con precipitación de proteínas con TCA

Especies	Variedades	AI (mU/mL)
Chocho (<i>L. mutabilis</i>)	I-450-Andino	23,88 ^B ± 1,31
Arveja (<i>P. sativum</i>)	I-432-Lojanita	32,65 ^A ± 0,79
Fréjol (<i>P. vulgaris</i>)	I-414-Yunguilla	36,71 ^A ± 0,79
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	INIAP-Cañicapa	35,19 ^A ± 3,14

Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

El permeado de fréjol purificado con TCA presentó la mayor actividad inhibidora; mientras que, el permeado de arveja purificado con TCA presentó la menor actividad inhibidora. Entre ellos existe un porcentaje de diferencia del 11,06 %. Sin embargo, estadísticamente, las actividades inhibidoras de los permeados de fréjol, arveja y cebada purificados con TCA no presentaron diferencias

significativas. Sus actividades inhibitoras son mayores a la del permeado de chocho purificado con TCA, en un 34,95; 26,86 y 32,14 %, respectivamente.

En la Figura 3.4., se aprecia la menor actividad inhibitora obtenida por el permeado de chocho, purificado con TCA, con respecto a las actividades obtenidas con los demás permeados, purificados con TCA y las similitudes de actividad inhibitora entre ellos.



Figura 3.4. Actividad inhibitora de la tripsina de los permeados purificados con precipitación de proteínas con TCA

En la Tabla 3.12., se presentan las actividades inhibitoras de los permeados crudos, purificados térmicamente y purificados con TCA.

Tabla 3.12. Actividades inhibitoras de los permeados crudos, purificados térmicamente y purificados con TCA

Especies	Variedades	AI (mU/mL) Permeados crudos	AI (mU/ mL) Permeados purificados térmicamente	AI (mU/ mL) Permeados purificados con TCA
Chocho (<i>L. mutabilis</i>)	I-450-Andino	28,50 ^A ± 0,73	23,28 ^B ± 0,89	23,88 ^B ± 1,31
Arveja (<i>P. sativum</i>)	I-432-Lojanita	13,37 ^B ± 0,35	6,99 ^C ± 0,15	32,65 ^A ± 0,79
Fréjol (<i>P. vulgaris</i>)	I-414-Yunguilla	17,56 ^C ± 0,81	22,01 ^B ± 1,41	36,71 ^A ± 0,79
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	INIAP-Cañicapa	21,53 ^B ± 0,72	7,65 ^C ± 0,46	35,19 ^A ± 3,14

Las letras diferentes entre las actividades inhibitoras de permeados crudos, purificados térmicamente y purificados con TCA indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

Las actividades inhibitoras de los permeados purificados con TCA fueron mayores con respecto a las actividades de los permeados purificados térmicamente, para el de arveja, en un 78,59 %; para el de fréjol, en un 40,04 % y para el de cebada, en un 79,20 % y tuvieron diferencias estadísticamente significativas con excepción del permeado purificado con TCA de chocho, el cual no presentó diferencias estadísticamente significativas con la actividad del permeado de chocho purificado térmicamente, por lo que se puede decir que una vez eliminados otros compuestos contaminantes del permeado crudo ninguno de los dos tratamientos afecta o varía la actividad inhibitora.

Las actividades inhibitoras de los permeados purificados con TCA tuvieron diferencias estadísticamente significativas y fueron mayores a las actividades de los permeados crudos, para el de arveja, en un 59,05 %; para el de fréjol, en un 52,17 % y para el de cebada, en un 22,73 %; con excepción del permeado purificado con TCA de chocho, cuya actividad inhibitora fue menor a la de su permeado crudo, en un 16,21 %. Con excepción del permeado de chocho purificado con TCA, el incremento de la actividad inhibitora de los demás permeados purificados con TCA pudo deberse a que la purificación con TCA provocó la disociación de complejos formados entre inhibidores y otras moléculas, con lo cual, estos inhibidores liberados incrementaron la actividad inhibitora de la tripsina.

3.4.2.2. Concentración de proteína y actividad inhibitora específica de los permeados purificados con precipitación de proteínas con TCA

La concentración de proteína y la actividad inhibitora específica de los permeados purificados mediante precipitación de proteínas con TCA, se presentan en la Tabla 3.13.

Tabla 3.13. Concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los permeados purificados con precipitación de proteínas con TCA

Especie	Variedades	[P] (mg/mL)	AI esp (mU/mg)
Chocho (<i>L. mutabilis</i>)	I-450-Andino	4,52	5,283 ^C ± 0,290
Arveja (<i>P. sativum</i>)	I-432-Lojanita	3,65	8,944^B ± 0,217
Fréjol (<i>P. vulgaris</i>)	I-414-Yunguilla	1,85	19,842 ^A ± 0,426
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	INIAP-Cañicapa	1,71	20,580^A ± 1,834

Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

El permeado de cebada purificado con TCA tuvo el mayor valor de actividad específica y no tuvo diferencias estadísticamente significativas con la actividad específica del permeado de fréjol purificado con TCA, mientras que el permeado de arveja purificado con TCA presentó la menor actividad específica. Entre los permeados de cebada y arveja purificados con TCA existe un porcentaje de diferencia de la actividad inhibidora específica del 56,54 %.

La concentración de proteína del permeado de arveja tratado con TCA fue 53,15 % mayor que la del permeado de cebada purificado con TCA y su actividad específica fue 56,54 % menor. Esto indica que el permeado de cebada purificado con TCA fue más eficiente que el permeado de arveja purificado con TCA.

Las actividades específicas de los permeados de cebada y arveja purificados con TCA fueron mayores en un 74,33 y 40,93 %, respectivamente, con respecto a la actividad específica del permeado de chocho purificado con TCA (5,283 ± 0,290 mU/mg), esto indica la alta concentración proteica que persiste en el permeado de chocho a pesar de la aplicación de este método de purificación.

Con respecto a la concentración de proteína del permeado de chocho purificado con TCA (4,52 mg/mL), la concentración proteica de los permeados de cebada y arveja fueron menores en un 62,17 y 19,25 %, respectivamente.

En la Figura 3.5., se presentan las actividades inhibitoras específicas de los permeados purificados con TCA.

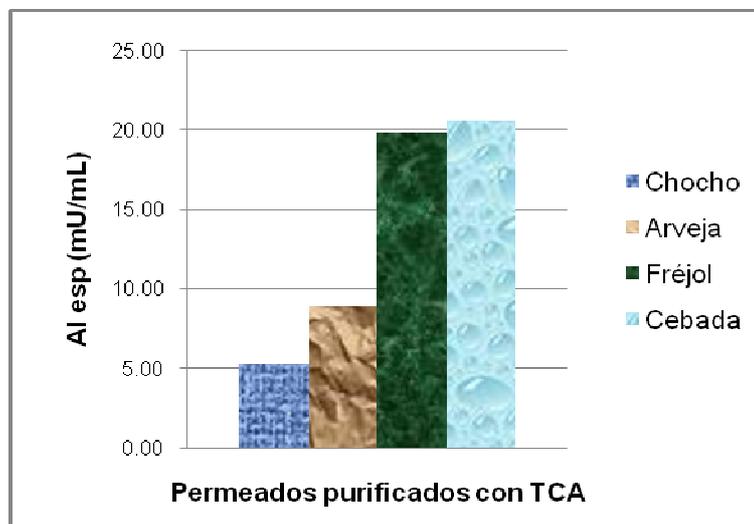


Figura 3.5. Actividad inhibitora específica de los permeados purificados con precipitación de proteínas con TCA

En la Tabla 3.14., se presentan las actividades inhibitoras específicas de los permeados crudos, purificados térmicamente y purificados con TCA.

Tabla 3.14. Actividades inhibitoras específicas de los permeados crudos, purificados térmicamente y purificados con TCA

Especies	Variedades	AI esp (mU/ mg) Permeados crudos	AI esp (mU/mg) Permeados purificados térmicamente	AI esp (mU/mg) Permeados purificados con TCA
Chocho (<i>L. mutabilis</i>)	I-450-Andino	0,833 ^B ± 0,021	0,666 ^B ± 0,026	5,283 ^A ± 0,290
Arveja (<i>P. sativum</i>)	I-432-Lojanita	1,251 ^B ± 0,033	0,921 ^C ± 0,020	8,944 ^A ± 0,217
Fréjol (<i>P. vulgaris</i>)	I-414-Yunguilla	1,309 ^C ± 0,060	2,297 ^B ± 0,147	19,842 ^A ± 0,426
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	INIAP-Cañicapa	1,870 ^B ± 0,021	0,881 ^B ± 0,052	20,580 ^A ± 1,834

Las letras diferentes entre las actividades inhibitoras específicas de permeados crudos, purificados térmicamente y purificados con TCA indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

Los permeados purificados con TCA tuvieron actividades específicas mayores a las obtenidas por los permeados purificados térmicamente, para el de chocho, en

un 87,39 %; para el de arveja, en un 89,70 %; para el de fréjol, en un 88,42 % y para el de cebada, en un 95,90 %. Esto indica que se conservó y aumentó la actividad inhibidora de la tripsina con menor cantidad de proteína. Entre los permeados de estos dos métodos de purificación existieron diferencias estadísticamente significativas.

Las actividades específicas de los permeados purificados con TCA fueron también mayores a las de los permeados crudos, para el de chocho, mayor en un 84,28 %; para el de arveja, mayor en un 86,01 %; para el de fréjol, mayor en un 93,40 % y para el de cebada, mayor en un 88,52 %. Esto indica que hubo mayor actividad inhibidora de la tripsina, con menor concentración de proteína en los permeados purificados con TCA, que en los permeados crudos. Entre los permeados de estos dos métodos de purificación existieron diferencias estadísticamente significativas.

En general, se eliminó gran cantidad de proteína con el método del TCA, que limitaba la acción de los inhibidores de tripsina.

3.4.3. TRATAMIENTO TÉRMICO CON BAÑO MARÍA Y PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON TCA

Se realizó la combinación de ambos métodos de purificación parcial en los permeados crudos de las especies seleccionadas y del chocho según lo descrito en el acápite 2.5.3.

3.4.3.1. Actividad inhibidora de los permeados purificados con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA

La actividad inhibidora de la tripsina, que presentaron los permeados purificados con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA, se presentan en la Tabla 3.15.

Tabla 3.15. Actividad inhibidora de la tripsina de permeados purificados con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA

Especies	Variedades	AI (mU/mL)
Chocho (<i>L. mutabilis</i>)	I-450-Andino	36,87 ^C ± 0,33
Arveja (<i>P. sativum</i>)	I-432-Lojanita	45,07^A ± 1,04
Fréjol (<i>P. vulgaris</i>)	I-414-Yunguilla	42,28 ^B ± 1,25
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	INIAP-Cañicapa	33,49^D ± 0,65

Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

El permeado de arveja purificado térmicamente y con TCA presentó la mayor actividad inhibidora y presentó diferencias significativas con respecto a las demás actividades obtenidas, mientras que el permeado de cebada purificado térmicamente y con TCA tuvo la menor actividad; entre estas especies existe un porcentaje de diferencia de actividad inhibidora del 25,68 %.

Con respecto a la actividad inhibidora del permeado de chocho (36,87 ± 0,33 mU/mL), las actividades de los permeados de arveja y cebada son 18,19 % mayor y 9,16 % menor, respectivamente.

En la Figura 3.6., se aprecia gráficamente la mayor actividad inhibidora obtenida por el permeado de arveja con respecto a las actividades inhibidoras obtenidas con los demás permeados purificados con ambos tratamientos.

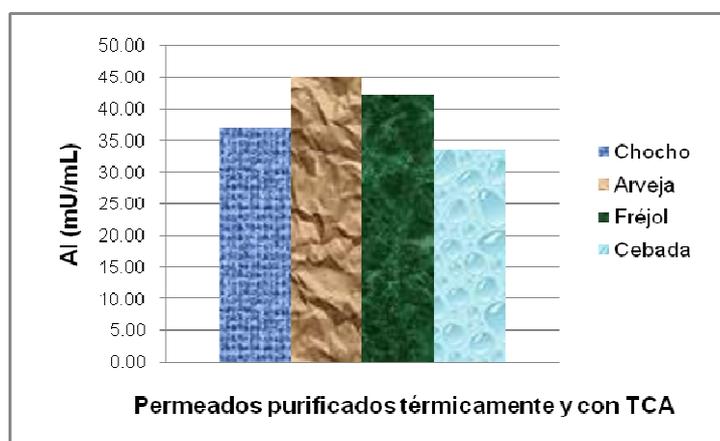


Figura 3.6. Actividad inhibidora de la tripsina de los permeados purificados térmicamente y con TCA

En la Tabla 3.16., se presentan las actividades inhibitoras de los permeados crudos, purificados térmicamente, purificados con TCA y purificados térmicamente y con TCA.

Tabla 3.16. Actividades inhibitoras de los permeados crudos, purificados térmicamente, purificados con TCA y purificados térmicamente y con TCA

Especies	AI (mU/mL) Permeados crudos	AI (mU/ mL) Permeados purificados térmicamente	AI (mU/ mL) Permeados purificados con TCA	AI (mU/ mL) Permeados purificados térmicamente y con TCA
Chocho (<i>L. mutabilis</i>) I-450-Andino	28,50 ^B ± 0,73	23,28 ^C ± 0,89	23,88 ^C ± 1,31	36,87 ^A ± 0,33
Arveja (<i>P. sativum</i>) I-432-Lojanita	13,37 ^C ± 0,35	6,99 ^D ± 0,15	32,65 ^B ± 0,79	45,07 ^A ± 1,04
Fréjol (<i>P. vulgaris</i>) I-414-Yunguilla	17,56 ^D ± 0,81	22,01 ^C ± 1,41	36,71 ^B ± 0,79	42,28 ^A ± 1,25
Cebada (<i>H. vulgare</i>) INIAP-Cañicapa	21,53 ^B ± 0,72	7,65 ^C ± 0,46	35,19 ^A ± 3,14	33,49 ^A ± 0,65

Las letras diferentes entre las actividades inhibitoras de permeados crudos, purificados térmicamente, con TCA y purificados térmicamente y con TCA indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

Las actividades inhibitoras obtenidas con los permeados purificados térmicamente y con TCA fueron mayores y presentaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con las actividades inhibitoras de los permeados purificados solo con TCA, con excepción del permeado de cebada, en el cual se observa una disminución de la actividad inhibitora, debido a que el tratamiento térmico afectó y disminuyó la actividad de los inhibidores pero no presentaron diferencias estadísticas significativas.

Los permeados de chocho y arveja purificados térmicamente y con TCA fueron los que mayor aumento de actividad inhibitora de la tripsina presentaron, con 1,54 y 1,38 veces más, respectivamente. Esto indica, que al combinar los dos métodos de purificación, se logran recuperar los inhibidores que se afectaron por el método calórico (desnaturación o precipitación), por lo que fue más conveniente.

En consecuencia, las actividades inhibitoras obtenidas con permeados purificados térmicamente y con TCA también fueron mayores que las actividades presentadas por los permeados purificados térmicamente y a los permeados crudos.

La conservación y aumento de la actividad inhibitora de los permeados con este método de purificación, pudo deberse a que el TCA fue añadido en el permeado purificado térmicamente sin la eliminación del precipitado que contenían, por lo que se conservaron moléculas de inhibidores que se eliminaron al aplicar solo tratamiento térmico. Puede haber la posibilidad de que los inhibidores que se afectaron con el tratamiento térmico, se hayan resuspendido o disociado de las moléculas que precipitaron por el calor.

3.4.3.2. Concentración de proteína y actividad inhibitora específica de los permeados purificados con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA

La concentración de proteínas y la actividad inhibitora específica con los permeados purificados con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA, se presentan en la Tabla 3.17.

Tabla 3.17. Concentración de proteína y actividad inhibitora específica de los permeados purificados con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA

Especies	Variedades	[P] (mg/mL)	AI esp (mU/mg)
Chocho (<i>L. mutabilis</i>)	I-450-Andino	6,37	5,789 ^D ± 0,051
Arveja (<i>P. sativum</i>)	I-432-Lojanita	3,00	15,024^C ± 0,345
Fréjol (<i>P. vulgaris</i>)	I-414-Yunguilla	1,91	22,138 ^B ± 0,655
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	INIAP-Cañicapa	1,28	26,168^A ± 0,511

Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

El permeado de cebada purificado térmicamente y con TCA presentó la mayor actividad específica debido a que su concentración de proteína fue la más baja, esto, a pesar de que su actividad inhibitora fue la más baja de los tres permeados preseleccionados; además, presentó diferencias estadísticamente significativas

con respecto a las actividades inhibitoras de los otros permeados purificados térmicamente y con TCA.

El permeado de arveja tuvo la menor actividad específica a pesar de que su actividad inhibitora fue la más alta debido a que su concentración de proteína fue alta. La actividad específica del permeado de chocho purificado térmicamente y con TCA fue menor a las de los permeados de cebada y arveja purificados térmicamente y con TCA, en un 77,88 y 61,47 %; respectivamente y presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Las concentraciones de proteína de los permeados de cebada y arveja purificados térmicamente y con TCA fueron menores, en un 79,91 y 52,90 %, respectivamente, con respecto a la del permeado de chocho purificado térmicamente y con TCA. Esto quiere decir que los permeados de cebada y arveja purificados térmicamente y con TCA tuvieron mayores actividades específicas por sus menores concentraciones de proteína con respecto al permeado de chocho purificado térmicamente y con TCA y por las actividades inhibitoras que tuvieron diferencias significativas.

Al combinar el método de tratamiento térmico con la precipitación de proteínas con TCA hubo una mayor disminución de la concentración proteica; el tratamiento térmico favoreció la disminución de esta concentración.

En la Figura 3.7., se presentan las actividades inhibitoras específicas de los permeados purificados térmicamente y con TCA.

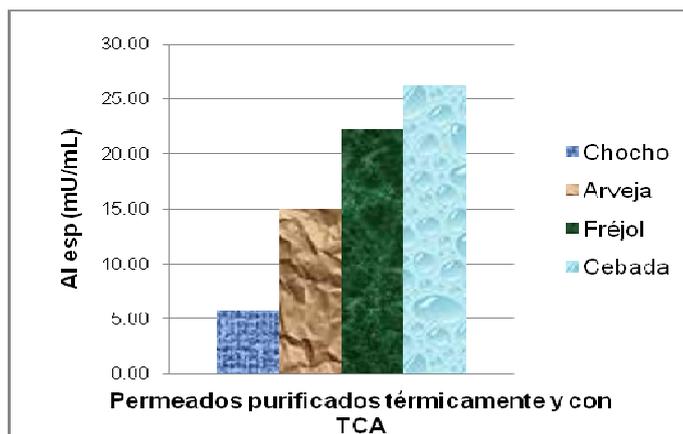


Figura 3.7. Actividades inhibitoras específicas de los permeados purificados térmicamente y con TCA

En la Tabla 3.18., se presentan las actividades específicas de los permeados crudos, purificados térmicamente, purificados con TCA y purificados térmicamente y con TCA.

Tabla 3.18. Actividad inhibitora específica de los permeados crudos, purificados térmicamente, purificados con TCA y purificados térmicamente y con TCA

Especies	AI esp (mU/mg) Permeados crudos	AI esp (mU/mg) Permeados purificados térmicamente	AI esp (mU/mg) Permeados purificados con TCA	AI esp (mU/mg) Permeados purificados térmicamente y con TCA
Chocho (<i>L. mutabilis</i>) I-450-Andino	0,833 ^C ± 0,021	0,666 ^C ± 0,026	5,283 ^B ± 0,290	5,789 ^A ± 0,051
Arveja (<i>P. sativum</i>) I-432-Lojanita	1,251 ^C ± 0,033	0,921 ^C ± 0,020	8,944 ^B ± 0,217	15,024 ^A ± 0,345
Fréjol (<i>P. vulgaris</i>) I-414-Yunguilla	1,309 ^C ± 0,060	2,297 ^C ± 0,147	19,842 ^B ± 0,426	22,138 ^A ± 0,655
Cebada (<i>H. vulgare</i>) INIAP-Cañicapa	1,870 ^C ± 0,021	0,881 ^C ± 0,052	20,580 ^B ± 1,834	26,168 ^A ± 0,511

Las letras diferentes entre las actividades inhibitoras específicas de permeados crudos, purificados térmicamente, con TCA y purificados térmicamente y con TCA indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha=0,05$)

Las actividades específicas obtenidas de los permeados purificado térmicamente y con TCA fueron mayores que las actividades específicas obtenidas con los permeados purificados solo con TCA y presentaron diferencias estadísticamente significativas.

El permeado de arveja purificado térmicamente y con TCA es el que mayor actividad específica presentó, en comparación con el permeado purificado solo con TCA, en 1,68 veces. Mientras que el permeado de chocho purificado térmicamente y con TCA tuvo una actividad inhibidora específica 1,10 veces mayor que la actividad específica del permeado solo con TCA, es decir, que hay poca diferencia pero si tienen diferencias estadísticamente significativas.

Los permeados purificados térmicamente y con TCA también tuvieron mayores y diferencias estadísticamente significativas con las actividades inhibidoras específicas de los permeados purificados con los otros dos métodos de purificación y en estado crudo.

3.5. EVALUACIÓN DE LA PURIFICACIÓN PARCIAL DEL PERMEADO DE CHOCHO Y DE LOS TRES PERMEADOS PRESELECCIONADOS

Para la evaluación de la purificación parcial de los permeados preseleccionados y del chocho, se calcularon las concentraciones de proteína totales y las actividades inhibidoras totales con los que se determinaron los parámetros de rendimiento en actividad inhibidora y en proteína, a más del grado de purificación para el cual se utilizaron las actividades inhibidoras específicas ya obtenidas. Un ejemplo de cálculo se muestra en el Anexo C.

El menor rendimiento en proteína y el mayor rendimiento en actividad inhibidora fueron de interés en la evaluación que se realizó debido a que el objetivo fue eliminar la proteína que interfería con la actividad de los inhibidores de tripsina.

3.5.1. EVALUACIÓN DE LA PURIFICACIÓN CON TRATAMIENTO TÉRMICO

Se realizó la evaluación de la purificación parcial del permeado de chocho y de los 3 permeados preseleccionados con los resultados de actividad inhibidora y específica obtenidos con tratamiento térmico, respecto a los resultados de los permeados crudos, presentados en el acápite 3.2.

En la Tabla 3.19., se presentan los valores de rendimiento en actividad inhibidora, en proteína y grado de purificación (GP) de los permeados purificados térmicamente.

Tabla 3.19. Rendimiento en proteína, en actividad inhibidora y grado de purificación de los permeados preseleccionados y del chocho con tratamiento térmico

Especies (Permeados)	Rendimiento en Proteína (%)	Rendimiento en Actividad (%)	GP (veces)
Chocho <i>L. mutabilis</i> (I-450-Andino)	72,14	57,67	0,80
Arveja <i>P. sativum</i> (I-432-Lojanita)	50,06	36,87	0,74
Fréjol <i>P. vulgaris</i> (I-414-Yunguilla)	74,55	130,80	1,75
Cebada <i>H. vulgare</i> (INIAP-Cañicapa)	94,27	44,44	0,47

El permeado de cebada purificado térmicamente tuvo el mayor rendimiento en proteína, esto quiere decir que no se eliminó mayor cantidad de proteína con respecto al permeado crudo, sin embargo, tuvo el menor rendimiento en actividad inhibidora.

El menor rendimiento en proteína fue del permeado de arveja, el cual tuvo bajo rendimiento en actividad junto con los permeados de chocho y cebada. Esto pudo ser por la desnaturación de los inhibidores y de otras moléculas que inhibían la actividad de la tripsina con la formación de complejos. También puede darse el caso de que se hayan desnaturado complejos formados entre inhibidores y otras moléculas, lo cual hizo que disminuya indirectamente la actividad y no necesariamente por la afectación directa de los inhibidores (Goyoaga, 2 005).

El permeado de fréjol purificado térmicamente tuvo el mayor rendimiento en actividad, esto indica que la actividad de las moléculas después de este método, fue mayor que en el permeado crudo, esto podría deberse a que se eliminaron proteínas que interferían con la actividad de los inhibidores proteicos. Este

rendimiento fue mayor que del permeado de chocho purificado térmicamente en un 54,29 %.

Los rendimientos en actividad de los permeados de arveja y cebada purificados térmicamente fueron menores al del permeado de chocho purificado térmicamente en un 25,30 y 32,61 %, respectivamente.

El permeado de fréjol purificado térmicamente también tuvo el mayor grado de purificación, mientras que los demás permeados purificados térmicamente tuvieron grados de purificación menores o cercanos a 1.

3.5.2. EVALUACIÓN DE LA PURIFICACIÓN CON PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON TCA

Los rendimientos en proteína, en actividad inhibidora y grado de purificación de los resultados obtenidos por los permeados purificados con TCA, con respecto a los permeados crudos, se muestran en la Tabla 3.20.

Tabla 3.20. Rendimiento en proteína, actividad inhibidora de tripsina y grado de purificación de los permeados purificados con precipitación de proteínas con TCA

Especies (Permeados)	Rendimiento en Proteína (%)	Rendimiento en Actividad (%)	GP (veces)
Chocho <i>L. mutabilis</i> (I-450-Andino)	46,30	123,21	6,34
Arveja <i>P. sativum</i> (I-432-Lojanita)	64,71	313,08	7,15
Fréjol <i>P. vulgaris</i> (I-414-Yunguilla)	41,80	303,03	15,16
Cebada <i>H. vulgare</i> (INIAP-Cañicapa)	32,58	161,78	8,71

En la Tabla 3.20., se puede ver que todos los permeados purificados con precipitación de proteínas con TCA tuvieron un rendimiento en actividad y un grado de purificación altos, mayor al 123,21 % en el primer parámetro y en el segundo parámetro, mayor a 6,34 veces.

El permeado purificado con TCA de mayor rendimiento en proteína fue el de arveja y también tuvo el mayor rendimiento en actividad. En comparación con el permeado de chocho purificado con TCA tuvo mayor rendimiento en proteína en un 9,72 % y también mayor rendimiento en actividad en un 60,65 %.

El permeado de arveja purificado con TCA tuvo un alto grado de purificación de (7,15 veces), aunque fue el menor de los tres permeados preseleccionados purificados con TCA y fue mayor en un 11,35 % al del permeado de chocho purificado con TCA.

El menor rendimiento en proteína fue del permeado de cebada purificado con TCA, se eliminó proteína que interfería con la actividad inhibidora ya que su rendimiento en actividad fue alto (161,78 %). Este rendimiento fue el menor en comparación con los rendimientos en actividad de los permeados purificados con TCA y mayor en comparación con el permeado de chocho purificado con TCA. El permeado de fréjol purificado con TCA tuvo el mayor grado de purificación (15,16 veces).

Un estudio realizado por Pascual (2 005), indica que el rendimiento en actividad inhibidora del extracto del anélido marino *Hermodice carunculata*, Pallas, 1 766 (Polychaeta) purificado con TCA fue de 114,00 %, con respecto al extracto crudo y afirma que esto puede ser debido a que el tratamiento con el ácido TCA puede disociar los complejos o agregados que pueden formar los inhibidores con las proteínas y las sales presentes en los extractos crudos, al igual que disocia los complejos enzima-inhibidor y por lo tanto, no se manifiesta la actividad de todas las moléculas de inhibidores.

También reporta rendimiento de actividad inhibidora del 117,00 % y un grado de purificación de 350 veces al someter el extracto a una cromatografía de filtración en gel en Sephadex G-25.

Los altos grados de purificación concuerdan con el estudio de Goyoaga (2 005), en el que varios autores afirman que actualmente se utilizan condiciones ácidas

para extraer inhibidores de tripsina, ya que se ha comprobado que es un medio más selectivo a la hora de extraer los inhibidores, con lo que se evita una sobreestimación de los mismos. Se reduce la extracción de otros compuestos, como pueden ser otras proteínas o incluso taninos condensados, que compiten por su unión a la tripsina.

3.5.3. EVALUACIÓN DE LA PURIFICACIÓN CON TRATAMIENTO TÉRMICO Y PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON TCA

Los porcentajes de rendimiento en proteína, actividad inhibidora y el grado de purificación de los permeados a los cuales se les aplicó ambos métodos de purificación parcial con respecto a los permeados crudos, se muestran en la Tabla 3.21.

Tabla 3.21. Rendimiento en proteína, actividad inhibidora de tripsina y grado de purificación de los permeados purificados con tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA

Especies (Permeados)	Rendimiento en Proteína (%)	Rendimiento en Actividad (%)	GP (veces)
Chocho <i>L. mutabilis</i> (I-450-Andino)	49,54	190,27	6,95
Arveja <i>P. sativum</i> (I-432-Lojanita)	57,52	432,23	12,01
Fréjol <i>P. vulgaris</i> (I-414-Yunguilla)	45,85	349,06	16,91
Cebada <i>H. vulgare</i> (INIAP-Cañicapa)	24,94	153,98	11,08

El permeado de arveja purificado térmicamente y con TCA obtuvo el mayor rendimiento en actividad inhibidora y el mayor rendimiento en proteína. En comparación con el permeado de chocho purificado térmicamente y con TCA, el rendimiento en actividad fue un 56,70 % mayor y su rendimiento en proteína fue un 13,87 % mayor; es decir, que el permeado de arveja purificado térmicamente y con TCA fue más eficiente con este método que el permeado de chocho

purificado térmicamente y con TCA, pues tuvieron rendimientos en actividad diferentes y con similares rendimientos en proteína.

En la evaluación con tratamiento térmico, el rendimiento en actividad fue bajo para el permeado purificado térmicamente de arveja, pero al combinar ambos métodos de purificación no hubo un bajo rendimiento en actividad del permeado de arveja purificado térmicamente y con TCA, en comparación con la purificación solo con TCA. Como se dijo anteriormente, pudo haber una resuspensión del precipitado que se formó con el tratamiento térmico, en el que pudieron estar los inhibidores o los complejos formados con inhibidores.

El menor rendimiento en actividad fue del permeado de cebada purificado térmicamente y con TCA, también obtuvo el menor rendimiento en proteína y el menor grado de purificación. El método de tratamiento térmico disminuyó el rendimiento en actividad y en proteína en comparación con los rendimientos obtenido con el permeado purificado solo con TCA; el grado de purificación aumentó solo por el menor rendimiento proteico.

El permeado de chocho purificado térmicamente y con TCA, tuvo un rendimiento en proteína y un grado de purificación similares a los valores obtenidos en la evaluación solo con TCA, pero si hubo un incremento en el rendimiento en actividad, justificable por la disociación de complejos que limitaban la acción de los inhibidores.

El permeado de cebada purificado térmicamente y con TCA fue más eficiente que el permeado de chocho purificado térmicamente y con TCA, pues tuvo mayor rendimiento en actividad con menor rendimiento en proteína.

El permeado de fréjol purificado térmicamente y con TCA se destaca por su mayor grado de purificación de todos los permeados purificados térmicamente y con TCA. Con la aplicación de ambos métodos de purificación, los parámetros de evaluación aumentan en comparación con los parámetros obtenidos solo con TCA.

Es evidente que los métodos de purificación en los que intervino el TCA, tuvieron bajos rendimientos en proteína y por lo tanto, los grados de purificación son altos.

3.6. SELECCIÓN DEL PERMEADO CON MAYOR ACTIVIDAD INHIBIDORA DE TRIPSINA

Se seleccionó el permeado de arveja, variedad I-432-Lojanita purificado térmicamente y con TCA, como la especie con mayor valor absoluto de actividad inhibidora y mayor rendimiento en actividad.

Se presenta en la Figura 3.8., un resumen de las actividades inhibidoras de la tripsina obtenidas con los diferentes permeados sometidos a los tres métodos de purificación y en estado crudo.

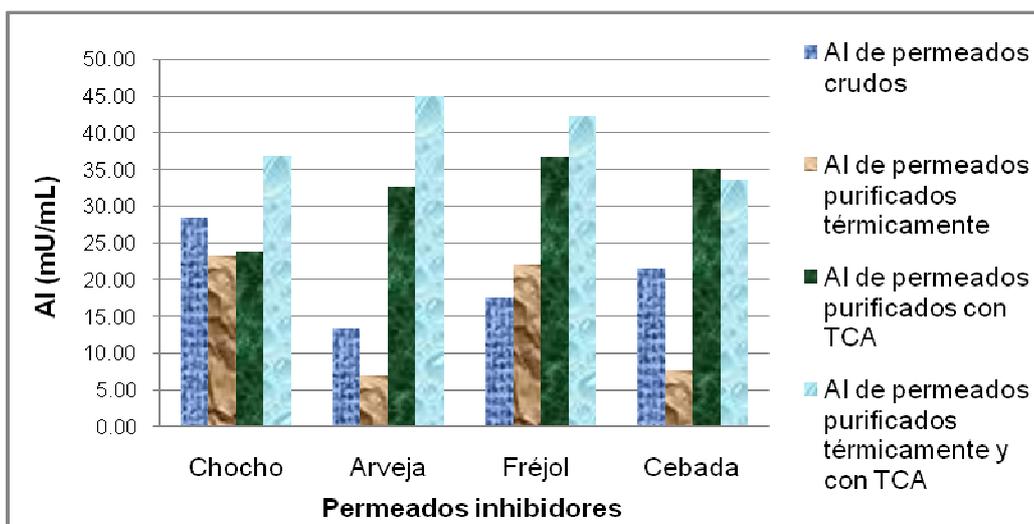


Figura 3.8. Actividades inhibidoras de los tres permeados preseleccionados y del chocho, en estado crudo y con los diferentes métodos de purificación parcial

En la Figura 3.6., se observa que las actividades inhibidoras de los diferentes permeados purificados por ambos métodos, son más altas que las actividades obtenidas con un solo método de purificación o en estado crudo, a excepción del permeado de cebada.

La actividad obtenida por el permeado de arveja purificado térmicamente y con TCA es 6,19 y 25,68 % mayor que las actividades obtenidas por el permeado de fréjol y el permeado de cebada, purificados con ambos métodos, respectivamente. La actividad inhibidora del permeado de arveja fue la más alta cuando se combinaron ambos métodos de purificación, con respecto a las actividades obtenidas con tratamiento térmico en un 84,86 % y con precipitación de proteínas con TCA en un 27,57 %.

La actividad inhibidora del permeado de arveja fue un 18,19 % mayor que la actividad inhibidora del permeado de chocho, con ambos métodos de purificación parcial.

Debido a que el permeado de arveja fue el de mayor actividad inhibidora de la tripsina, se realizaron ensayos de actividad inhibidora con el retenido de esta especie y también con el retenido de chocho, así como también la purificación de estos con los métodos utilizados para los permeados.

3.7. ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA TRIPSINA DE LOS RETENIDOS DE ARVEJA (*P. sativum*, var. I-432-Lojanita) Y CHOCHO (*L. mutabilis*, var. I-450-Andino)

Los retenidos de arveja y chocho fueron analizados para determinar la presencia de actividad inhibidora, la cual se pudo obtener solo con el método de purificación térmica en el caso del retenido de chocho y en el caso del retenido de arveja, solo con los métodos de purificación con TCA y purificación térmica y con TCA.

Esto se debió a que los retenidos presentaron características diferentes a los permeados, como un contenido abundante de moléculas de alto peso molecular, contenido de grasa, las cuales produjeron turbidez, sobre todo en el retenido de chocho.

Se determinó la concentración de proteína que poseía cada retenido en estado crudo. Tanto en el retenido de arveja como en el retenido de chocho, esta

concentración fue más alta que en los respectivos permeados. El retenido de chocho fue el de mayor concentración proteica con 176,04 mg/mL, mientras que la concentración del retenido de arveja fue de 54,90 mg/mL.

La mayor concentración proteica del retenido de chocho se debe a que las semillas de esta especie en general, poseen una mayor cantidad de proteína en comparación con otras leguminosas como el haba, la arveja o similar a la soya (Carabaño y Villamide, 1 996).

3.7.1. RETENIDO DE CHOCHO PURIFICADO CON TRATAMIENTO TÉRMICO

Se siguió el procedimiento descrito en el acápite 2.5.1., con el que se purificó el retenido de chocho con tratamiento térmico.

El retenido de chocho purificado térmicamente presentó una actividad inhibidora de $65,35 \pm 0,20$ mU/mL. Los tipos de inhibidores presentes en el retenido de chocho, mostraron estructuras resistentes a este método calórico.

La actividad inhibidora de tripsina del retenido de chocho purificado térmicamente fue mayor en un 66,42 % a la actividad inhibidora del permeado de chocho purificado térmicamente, cabe recalcar que el volumen obtenido de este retenido fue un 40,00 % mayor que el volumen del permeado mencionado.

Se puede decir que se obtuvo mayor actividad inhibidora con este retenido porque el volumen obtenido también fue mayor con relación al permeado citado, pero no existe una relación directa entre estos dos parámetros porque predomina la mayor actividad inhibidora del retenido de chocho purificado térmicamente.

La concentración de proteína fue de 31,28 mg/mL, la cual disminuyó en un 82,23 % con respecto a la del retenido crudo y fue un 10,48 % menor que del permeado de chocho purificado térmicamente. La actividad inhibidora específica fue de $2,089 \pm 0,006$ mU/mg y fue un 69,94 % mayor que la actividad específica del permeado con tratamiento térmico.

El retenido de chocho purificado térmicamente tuvo mayor actividad inhibidora de la tripsina con similar concentración de proteína en comparación con el permeado de chocho purificado térmicamente, es decir, fue más eficiente.

3.7.2. RETENIDO DE ARVEJA PURIFICADO CON PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON TCA

Se realizó la precipitación de proteínas con TCA, de acuerdo al método descrito en el acápite 2.5.2. El retenido de arveja presentó actividad inhibidora en la fracción número 2 mientras que en las 4 restantes no se presentó inhibición.

La actividad inhibidora del retenido de arveja purificado con TCA fue igual a $16,62 \pm 0,19$ mU/mL y fue 49,10 % menor a la del permeado purificado con TCA. La concentración de proteína del retenido de arveja purificado con TCA fue igual a 5,17 mg/mL y fue mayor a la del permeado de arveja purificado con TCA en un 29,40 %. Cabe recalcar que no hubo diferencia entre los volúmenes que se usaron tanto del retenido como del permeado mencionados, los cuales fueron iguales a 5 mL.

El retenido de arveja purificado con TCA, tuvo menor actividad inhibidora a pesar de la mayor concentración de proteína con respecto al permeado de arveja purificado con TCA, es decir, que fue menos eficiente que el permeado purificado con TCA. La concentración de proteína del retenido de arveja purificado con TCA fue menor a la del retenido de arveja crudo en un 90,58 %.

La actividad inhibidora específica del retenido purificado con TCA fue igual a $3,21 \pm 0,04$ mU/mg y fue 64,07 % menor que la actividad específica del permeado de arveja purificado con TCA.

3.7.3. RETENIDO DE ARVEJA PURIFICADO CON TRATAMIENTO TÉRMICO Y PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON TCA

Se realizó la purificación del retenido de arveja según el método descrito en el acápite 2.5.3. y se obtuvieron resultados de actividad inhibidora, concentración de proteína y actividad inhibidora específica de tripsina solamente para la fracción número 2 del retenido de arveja, debido a que las demás fracciones no presentaron inhibición.

La actividad inhibidora del retenido de arveja purificado térmicamente y con TCA fue igual a $16,53 \pm 0,79$ mU/mL y fue similar a la actividad obtenida con el retenido de arveja purificado solo con TCA, por lo que la aplicación de tratamiento térmico no afectó la actividad inhibidora en este retenido; también fue un 63,32 % menor con respecto a la actividad inhibidora del permeado de arveja purificado térmicamente y con TCA. Cabe recalcar que no hubo diferencia entre los volúmenes que se usaron tanto del retenido como del permeado mencionados, los cuales fueron iguales a 5 mL.

La concentración de proteína fue igual a 4,07 mg/mL, esta fue 92,59 % menor que el retenido de arveja crudo y un 26,29 % mayor que la concentración de permeado de arveja purificado térmicamente y con TCA. Esta concentración disminuyó ligeramente con respecto a la concentración del retenido purificado solo con TCA.

La actividad específica fue igual a $4,061 \pm 0,195$ mU/mg y fue un 20,86 % mayor a la del retenido purificado con TCA y un 72,97 % menor a la actividad específica del permeado de arveja purificado térmicamente y con TCA.

Esto quiere decir, que el permeado de arveja fue más eficiente que el retenido de arveja purificado con ambos métodos; pero el retenido purificado con ambos métodos fue más eficiente que el retenido purificado solo con TCA.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

1. Los extractos obtenidos a partir de las semillas de leguminosas y gramíneas analizados se separaron en permeado y retenido para cada uno de ellos, debido a la aplicación de la ultrafiltración mediante membranas permeables con un límite de peso molecular nominal (MWCO) de 10kDa.
2. Se obtuvieron actividades inhibitoras de la tripsina con los permeados crudos y purificados parcialmente con tratamiento térmico, precipitación de proteínas con TCA y combinación de ambos métodos de las semillas de chocho (*Lupinus mutabilis*, var. I-450-Andino), iguales a $28,50 \pm 0,73$; $23,28 \pm 0,89$; $23,88 \pm 1,31$ y $36,87 \pm 0,33$ mU/mL, respectivamente.
3. El retenido de chocho purificado con el método de tratamiento térmico fue más eficiente y más activo que el permeado de chocho purificado con este método, debido a que presentó mayor actividad inhibitora de la tripsina y mayor actividad específica, iguales a $65,35 \pm 0,20$ mU/mL y $2,089 \pm 0,006$ mU/mg, respectivamente.
4. Se logró establecer un procedimiento general que permitió obtener actividades inhibitoras de la tripsina con permeados crudos obtenidos a partir de semillas de leguminosas y gramíneas, con valores entre $3,46 \pm 0,18$ y $17,56 \pm 0,81$ mU/mL.
5. El método utilizado para la obtención de un permeado con actividad inhibitora de tripsina fue sencillo y suficiente para determinar los permeados que podrían tener una mayor actividad inhibitora con posteriores métodos de purificación de alta resolución.

6. Se seleccionó al permeado de arveja (*Pisum sativum*, var. I-432-Lojanita) purificado térmicamente y con TCA porque presentó la mayor actividad inhibidora igual a $45,07 \pm 1,04$ mU/mL y el mayor rendimiento en actividad inhibidora de 432,23 %. Este permeado, además, mostró un grado de purificación de 12,01 veces y un rendimiento en proteína de 57,52 %.
7. Los permeados de arveja purificados con el método de precipitación de proteínas con TCA y con el método combinado de tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA fueron más activos que los retenidos de arveja purificados con estos métodos, porque mostraron actividades inhibidoras y actividades específicas más altas.
8. El permeado de fréjol (*Phaseolus vulgaris*, var I-414-Yunguilla) purificado con la combinación de los métodos de tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA tuvo el mayor grado de purificación igual a 16,91 veces.
9. La combinación de los métodos de tratamiento térmico y precipitación de proteínas con TCA produjo un aumento de las actividades inhibidoras de la tripsina, de los permeados de chocho, arveja y fréjol, por lo que se obtuvieron mayores rendimientos en actividad y mayores grados de purificación que al usar cada método por separado.
10. Entre los extractos de las semillas de gramíneas analizadas, el permeado de cebada (*Hordeum vulgaris*, var. INIAP-Cañicapa) mostró la mayor actividad inhibidora de la tripsina, con un valor de $21,53 \pm 0,72$ mU/mL, en comparación con los permeados de trigo, maíz y centeno.

4.2. RECOMENDACIONES

1. Mejorar el procedimiento de obtención de retenidos con la aplicación de un método de desengrasado para que sean adecuados para los ensayos espectrofotométricos de actividad inhibidora.
2. Determinar la actividad inhibidora de la tripsina del retenido de fréjol debido a que su permeado mostró aumento de actividad inhibidora con todos los métodos de purificación.
3. Aplicar métodos de purificación de alta resolución para caracterizar los inhibidores de tripsina, determinar su especificidad, características moleculares, tipos de inhibición, entre otros, presentes en los permeados de chocho, arveja y fréjol.
4. Profundizar el estudio del extracto de cebada que mostró la mayor actividad en su forma cruda, pero perdió considerablemente la actividad cuando su permeado fue purificado térmicamente, con TCA y con la combinación del tratamiento térmico y TCA.
5. Analizar la actividad inhibidora de los permeados de chocho, arveja, fréjol y cebada, sobre otras enzimas que sean de interés biotecnológico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez, C., Márquez, G., Arias, L., Contreras, W., Uscanga, A., Perales, N., Moyano, F., Hernández, R., Civera, R., Goytortua, E., Isidro, L., Almeida, J., Tovar, D., Gutiérrez, J., Arévalo, L., Enric, G., Treviño, L. y Morales, B., 2008, "Análisis en la fisiología digestiva y digestión de la Mojarra Tenguayaca *Petenia splendida*", http://web.uanl.mx/publicaciones/nutricion_acuicola/IX/archivos/10-Alvarez.pdf, (Agosto, 2010).
2. Amersham Biosciences AB, 2003, "PD-10 Desalting Column", http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/dialysis/AMERSHAM_PD10Desalting.pdf, (Agosto, 2010).
3. Avanza, M. y Añón, M., 2006, "Efecto del tratamiento térmico en las propiedades fisicoquímicas de albúminas y globulinas de *Amaranthus Hypochondriacus*", <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-031.pdf>, (Noviembre, 2010).
4. Barreto, E. y Monteghirfo, M., 1995, "Estudios mediante electroforesis unidimensional de las proteínas de semillas de *Lupinus mutabilis*", <http://www.lamolina.edu.pe/simbiosis/investig/unmsm.htm>, (Noviembre, 2010).
5. Blanco, A. y Aguirre, C., 2002, "Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas", <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/416/41612201.pdf>, (Febrero, 2011).
6. Berg M., Tymoczko J. y Stryer L., 2008, "Bioquímica. Protocolo de purificación de proteínas", <http://books.google.com/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PR20&lpg=PR20&dq=evaluaci%C3%B3n+purificaci%C3%B3n+prote%C3>, (Noviembre, 2010).

7. Bonzon, E., 1996, "Obtención de una matriz de afinidad de Tripsina-Glioxil-Sepharosa CL-4B para la purificación del inhibidor de proteasas de *Stichodactyla heliantus*", Trabajo de Diploma, Universidad de la Habana, Ciudad de la Habana, Cuba, p. 38.
8. Botanical-online, 2011, "Los cereales", <http://www.botanical-online.com/cereales.htm>, (Marzo, 2011).
9. Brenes, A. y Brenes, J., 1993, "Tratamiento tecnológico de los granos de leguminosas: influencia sobre su valor nutritivo", http://www1.etsia.upm.es/fedna/capitulos/93CAP_11.pdf, (Noviembre, 2010).
10. Caffini, N., López, L., Natalucci, C. y Priolo, N., 1988, "Proteasas de plantas superiores. I. Características generales, rol fisiológico y aplicaciones", <http://www.latamipharm.org/trabajos/7/3/LAJOP7331257F9GN9NH.pdf>, (Marzo, 2011).
11. Cameán, A., 2007, "Toxicología Alimentaria", <http://site.ebrary.com/lib/epnsp/Doc?id=10159965&ppg=257>, (Julio, 2009).
12. Carabaño, R. y Fraga, M., 1992, "The use of local feeds for rabbits", <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/a17/92605171.pdf>, (Octubre, 2010).
13. Carabaño, R., Fraga, M. y Villamide, M., 1996. "Concentrados de proteínas para piensos de conejos", http://dialnet.unirioja.es/servlet/fichero_articulo?codigo=2869386&orden=0, (Junio, 2010).
14. Carrillo, L., 2009, "Cistatinas de cebada: proteínas de defensa contra artrópodos", http://oa.upm.es/3003/1/LAURA_CARRILLO_GIL.pdf, (Diciembre, 2010).

15. Castillo, F., Pacheco, R., García, F. y Navarrete, M., 2004, "Isolation and characterization of trypsin from *pyloric caeca* of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*", <http://www.bashanfoundation.org/carreno/carrenopyloric.pdf>, (Octubre, 2010).
16. Chávez, M.A., Díaz, J., Pérez, U. y Delfín, J., 1990, "Conceptos de Bioquímica", Tomo II, ENPES, La Habana, Cuba, p.p. 41,42, 207-210.
17. Christensen, H. y Palmer, G., 1980, <http://books.google.com/books?id=mgo2fIX50wC&pg=PA120&lpg=PA120&dq=ensayos+enzim%C3%A1ticos+%2B+Christensen+y+Palmer,+1980&source=bl&ots=IBInphsY5O&si>, (Enero, 2011).
18. Comoglio, L., Goldsmit, J. y Amin, O., 2008, "Starvation effects on physiological parameters and biochemical composition of the hepatopancreas of the southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782)", <http://www.scielo.cl/pdf/revbiolmar/v43n2/art12.pdf>, (Julio, 2010).
19. Daroch, 2002, "Sustitución parcial de la harina de pescado por harina de haba (*Vicia faba* var. *minor* (Harz) Beck) en la formulación de alimento para salmónidos", <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2002/fad224s/doc/fad224s.pdf>, (Enero, 2011).
20. Dávila, M., Sangronis, E. y Granito, M., 2003, "Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales", http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222003000400003&script=sci_arttext&tlng=pt, (Diciembre, 2010).
21. Díaz, D., 2006, "Efecto de la extrusión sobre el contenido de compuestos antinutricios de harinas compuestas frijol-maíz nixtamalizado", <http://aztlan.mine.nu/files/BIOQUIMICA/files/EFFECTO%20DE%20LA%20EXTRUSION%20SOBRE%20EL%20CONTENIDO%20DE%20COMPUESTOS%20ANTINUTRICIOS%20DE%20HARINAS%20COMPUESTAS%20FRIJOL-MAIZ%20NIXTAMALIZADO>

[TOS%20ANTINUTRICIOS%20DE%20HARINAS%20COMPUESTAS.pdf](#),

(Octubre, 2 010).

22. Ellenrieder, G., Geronazzo, H. y Bojarski, A., 1 980, "Thermal inactivation of trypsin inhibitors in aqueous extracts of soybeans, peanuts, and kidney beans: Presence of substances that accelerate inactivation", http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/backissues/1980/chem57_25.pdf, (Marzo, 2 011).
23. Erlanger, B., Kokowski, N. y Cohen, W., 1 961, "The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin". Arch. Biochem. Biophys. 95, pp. 271– 278.
24. Ernst, O., 2 004, "Leguminosas como cultivo de cobertura", [http://www.potafos.org/ppiweb/iaarg.nsf/\\$webindex/4D63CE7B3A2197D203256E600071D400/\\$file/Leguminosa+Cultivo+Cobertura-Ernst.pdf](http://www.potafos.org/ppiweb/iaarg.nsf/$webindex/4D63CE7B3A2197D203256E600071D400/$file/Leguminosa+Cultivo+Cobertura-Ernst.pdf), (Diciembre, 2 010).
25. Espinoza, R., 2 006, "Estudio de la fermentación de harina de *Lupinus albus*", <http://dspace.fica.ufro.cl:8080/jspui/bitstream/123456789/138/1/RobRoberto%20Espinoza%20Cortes.pdf>, (Diciembre, 2 010).
26. Estrada, J., 2 002, "Pastos y forrajes para el trópico colombiano". <http://books.google.com.ec/books?id=qhbLgdouyJkC&pg=PA225&lpg=PA225&dq=taxonom%C3%ACa%2Bleguminosas&source>, (Diciembre, 2 010).
27. FAO, 1 990, "Estudio de los alimentos tropicales: cereales", <http://books.google.com/books?id=O-sUZiFTKJQC&pg=PP2&lpg=PP2&dq=estudio+de+los+alimentos+tropicales:+cereales&source=bl&ots=ZTFly2a>, (Enero, 2 011).
28. FAO, 2 006, "Mercado rural", <http://www.rlc.fao.org/es/desarrollo/mujer/docs/ecuador/cap05.pdf>, (Enero de 2 011).

29. Félix, M., García, K., Velázquez, E., Castillo, F., Pacheco, R. y Sotelo, R., 2005, "Comparación estructural de tripsina de sardina (*Sardinops sagax caerulea*) y bovina mediante espectroscopía de dicroísmo circular", <http://www.dipa.uson.mx/work/resources/LocalContent/66189/1/biotecnologia.pdf>, (Diciembre, 2010).
30. Fernández, F., 2006, "Aplicación de la proteómica a la caracterización de mecanismos patogénesis en *Botrytis cinerea*. Utilización y evaluación de nuevos fungicidas", <http://minerva.uca.es/publicaciones/asp/docs/tesis/FJFernandezAcero.pdf>, (Enero, 2011).
31. Fraile, M., García, M., Martínez, A. y Slomianski, R., 2007, "Nutritivas y apetecibles: conozca de leguminosas comestibles. Parte I. Hojas, vainas y semillas", <http://www.izt.uam.mx/contactos/n66ne/leguminosas.pdf>, (Diciembre, 2010).
32. Gallegos, S., Pacheco, J., Betancur, D. y Chel L., 2004, "Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grano de *Phaseolus lunatus* L.", http://www.alanrevista.org/ediciones/2004-1/extraccion_caracterizacion_fracciones_proteinicas_phaseolus_lunatus.asp, (Noviembre, 2010).
33. García, R., Salas, A., Del Monte, M., Del Rivero, A., Guerra, Y. y Chávez, M., 2009, "Micro y nano-biotecnologías en la detección y caracterización de inhibidores de proteasas de interés biomédico", <http://www.fisica.uh.cu/biblioteca/revcubfi/2009/vol.26-No.1/RCF-26-1-2009-76.pdf>, (Diciembre, 2010).
34. Gastelum, T., 2009, "La Relación planta-ambiente: los conceptos de la botánica (Citología, Histología, Anatomía, Organografía) y la fisiología de las gramíneas y las leguminosas", <http://teresagastelummartinez.blogspot.com/2009/03/conceptos-basicos-de-botanica-y.html>, (Diciembre, 2010).

35. Geanta, R., 2009, "Recuperación de ácidos láctico y cítrico utilizando extracción micelar con membranas", http://dspace.ubu.es:8080/trabajos_academicos/bitstream/10259.1/59/1/Geanta.pdf, (Enero, 2010).
36. Glencross, B., 2001, "Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds", <http://www.fish.wa.gov.au/docs/op/op031/fop031.pdf>, (Noviembre, 2010).
37. Gomes, C., Barbosa, A., Macedo, L., Pitanga, J., Moura, F., Oliveira, A., Moura, R., Queiroz, A., Macedo, F., Andrade, L., Vidal, M. y Sales, M., 2005, "Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly)". <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16426854>, (Agosto, 2010).
38. Gómez, G., Quesada, S. y Nanne, C., 1998, "Efecto de factores antinutricionales en el pejibaye (*Bactris gasipaes*) sobre el metabolismo de ratas jóvenes", http://www.mag.go.cr/rev_agr/v22n02_191.pdf, (Julio, 2009).
39. González, A., Duarte A., Patto C., Piccolo M., 2008, "Caracterización química de la harina del fruto de *Prosopis spp.* procedente de Bolivia y Brasil", <http://www.scielo.org.ve/pdf/alan/v58n3/art15.pdf>, (Noviembre, 2010).
40. Goyoaga, C., 2005, "Estudio de factores no nutritivos en "*Vicia faba* L.: influencia de la germinación sobre su valor nutritivo", <http://eprints.ucm.es/tesis/far/ucm-t28827.pdf>, (Noviembre, 2010).
41. Guillamón, E., Pedrosa, M., Burbano, C., Cuadrado, C., De Cortes, M. y Muzquiz, M., 2007, "The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar", <http://www.phtnet.org/research/download/pdf/mb180.pdf>, (Julio, 2010).

42. Herbario de la Universidad Pública de Navarra, 2 011, “Familia Gramineae (Poaceae)”, <http://www.unavarra.es/servicio/herbario/htm/Gramineae.htm>, (Marzo, 2 011).
43. Habib, H. y Majid, K., 2 007, “Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants”, <http://www.academicjournals.org/bmbr/PDF/pdf2007/Aug/Habeeb%20and%20Khalid.pdf>, (Julio, 2 010).
44. Hernández, M. y Sastre, A., 1 999, “Tratado de nutrición”, <http://books.google.com/books?id=SQLNJOsZClwC&pg=PA405&lpg=PA405&dq=inhibidores+de+tripsina+en+endosperma&source>, (Enero, 2 011).
45. Hernández, R., 2 007, “Enzimas”, <http://www.forest.ula.ve/~rubenhq/enzimas/index.html#arriba>, (Marzo, 2 011).
46. Hospital La Fe de Valencia, Unidad de Alergia Infantil, 2 002, “Polen y alergia”, <http://www.alergiainfantillafe.org/gramineas.htm>, (Noviembre, 2 010).
47. Iniestra, J., Ibarra, F., Gallegos, J., Rocha, N. y González, R., 2 005, “Factores antinutricios y actividad antioxidante en variedades mejoradas de frijol común (*phaseolus vulgaris*)”, <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/302/30239603.pdf>, (Enero, 2 011).
48. Jabib, L., Barrios, P., Vega, A., 2 002, “Evaluación del frijol caupí (*vigna unguiculata*) como ingrediente proteico en dietas para pollos de asadero”, <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/693/69370105.pdf>, (Diciembre, 2 010).
49. Jardines Botánicos Reales, 2 005, “Leguminosas del Mundo”, 1º Edición, Editorial The Bath Press, Reino Unido, p. 10.

50. Johns, 1 987, "Influence of trypsin inhibitors in four varieties of peas (*Pisum sativum*) on the growth of chickens", <http://books.google.com/books?id=ieuysHYDkDIC&pg=PA174&lpg=PA174&dq=An+evaluation+of+natural+vs.+Synthetic+substrates+for+measuring+the+antitryptic+activity+of+soy-bean+samples&source=bl&ots=bclmrwpCbo&sig>, (Abril, 2 011).
51. Khalil, A., Mohamed, S., Taha, F. y Karlsson, E., 2 006, "Production of functional protein hydrolysates from Egyptian breeds of soybean and lupin seeds", <http://pdfcast.org/pdf/production-of-functional-protein-hydrolysates-from-egyptian-breeds-of-soybean-and-lupin-seeds>, (Julio, 2 009).
52. Latham, M., 2 002, "Nutrición humana en el mundo en desarrollo", <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s0v.htm>, (Diciembre, 2 010).
53. López, C., 2 000, "Proteasas y cáncer", http://www.investigacionyciencia.es/03004947000409/Proteasas_y_c%C3%A1ncer.htm, (Abril, 2 011).
54. Lqari H, Pedroche J, Girón J, Vioque J y Millán F, 2 004, "Purification and partial characterization of storage proteins in *Lupinus angustifolius* sedes", <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/download/202/202>, (Marzo, 2 011).
55. Martínez, M., Alarcón F., 1 998, "Efecto de los Inhibidores presentes en Materias Primas Vegetales sobre las Proteasas Alcalinas de Peces", <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=43>, (Octubre, 2 010).
56. Nadal, S., Moreno, M. y Cubero, J., 2 004, "Las leguminosas de grano en la agricultura moderna", <http://books.google.com/books?id=oPg-722dP8AC&pg=PA165&dq=ciclo+de+cultivo+de+las+leguminosas&source>, (Marzo, 2 011).
57. Nicora, E., y Rúgalo, Z., 1 987, "Los géneros de gramíneas de América austral". 1ºEd. Editorial Hemisferios Sur. Argentina pp. 9-11

58. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1985, "Procesamiento de semillas de cereales y leguminosas de grano", <http://books.google.com/books?id=44gxKGHjSt4C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>. (Enero, 2011).
59. Pascual, I., 2005, "Purificación y caracterización parcial del primer inhibidor natural de piroglutamil aminopeptidasa II (enzima que degrada al TRH), aislado del anélido marino *Hermodice carunculata*, Pallas, 1766 (Polychaeta)", Resumen de Tesis previa a la obtención del título de Doctora en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana, Ciudad de la Habana, Cuba, pp. 1, 10, 11, 12.
60. Paredes, E., 2009, "Principales cultivos agrícolas del país", <http://www.incca.gov.ec/incca/Documentos/principales%20cultivos%20agricolas%20del%20pais.doc>, (Enero, 2011).
61. Peralta, E., Murillo A., Pinzón J., 1995, "Frejol, su importancia económica, ecológica y social y la oferta tecnológica del programa nacional de leguminosas", http://www.preduza.org/le1_2.htm, (Enero, 2011).
62. Perissé, P., 2002, "Semillas, un punto de vista agronómico", <http://www.semilla.cyta.com.ar/caracteristicas/caracteristicas.htm>, (Marzo, 2011).
63. Primo, E., 2007, "Química básica y aplicada: de la molécula a la industria", http://books.google.com/books?id=aU_aBXvAB3MC&pg=PA1022&lpg=PA1022&dq=unidades+enzim%C3%A1ticas&source. (Enero, 2011).
64. Quintana M., Nápoles, J., Salas, B., Ulloa, L., Galdo, Y. y Carbonell, A., 2006. "Perfeccionamiento en la producción *in vitro* de leguminosas para la alimentación animal", www.forumcyt.cu/UserFiles/forum/Textos/0700907.doc, (Diciembre, 2010).

65. Reina, J., 2 000, "Separación de fracciones de lipasa de *Candida rugosa* con distintas propiedades en Química fina, por cromatografía de adsorción interfacial a soportes octil agarosa", Universidad Autónoma de Madrid, España, p. 16.
66. Rekha, K., Mukesh, K., Kalika, K., Ram, N., Bhattiprolu, S., Kirpa, R., Vijay, K., "Purification and characterization of trypsin inhibitor from *Cicer arietinum* L. and its efficacy against *Helicoverpa armigera*", 2 008, http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-04202008000400007&lng=es&nrm=iso&tlng=es, (Julio, 2 009).
67. Rodríguez, A., 2 007, "Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet)", <http://dspace.esepoch.edu.ec/bitstream/123456789/219/1/56T00193.pdf>, (Febrero, 2 011).
68. Sánchez, A., Ramírez, J., Morales, O. y Montejano J., 1 998, "Detección de inhibidores de proteasas en extractos de leguminosas y su efecto sobre proteasas endógenas del músculo de pescado", <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=72420102>, (Octubre, 2 010).
69. Schoeneberger, H., Gross R., Cremer H. y Elmadfa I., 1 982, "Composition and Protein Quality of *Lupinus Mutabilis*", <http://jn.nutrition.org/content/112/1/70.full.pdf>, (Julio, 2 009).
70. Seidl, D., Jaffé, M. y Jaffé, W., 1 969, "Digestibility and Proteinase Inhibitory Action of a Kidney Bean Globulin", http://www.fundacionbengoa.org/publicaciones/werner_jaffe/art.175.pdf, (Julio, 2 010).

71. Sierra, A. y Pérez, G., 1999, "Extracción, purificación y caracterización de dos lectinas en semillas de *Dioclea sericea*", http://www.accefyn.org.co/revista/Vol_23/88/445-454.pdf, (Enero, 2011).
72. Sierra, J., 2005, "Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros", http://books.google.com.ec/books?id=rbezH_RPHVYC&pg=PA25&lpg=PA25&dq=taxonom%C3%ACa%2Bleguminosas&source, (Enero, 2011).
73. Sinche, M., 2009, "Aislamiento, purificación parcial y caracterización cinética de las proteasas presentes en el látex de los frutos de una planta del género *Vasconcella*", Tesis Previa a la Obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, EPN, Quito-Ecuador.
74. Srivastava, O. y Ortwerth, B., 1983, "Purification and properties of a protein from bovine lens which inhibits trypsin and two endogenous lens proteinases", <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6403363>, (Diciembre, 2010).
75. Tovar, O., 1993, Monografías del real jardín botánico, Editorial Fareso S.A., España, p: 16.
76. Universidad Peruana Cayetano Heredia, 2006, "Espectrofotometría uv-vis, absorción atómica y de fluorescencia", <http://es.scribd.com/doc/47620832/ESPECTRO-UPCH>, (Enero, 2011).
77. Vetifarma, 2006, "Inhibidor de tripsina", <http://www.vetifarma.com.ar/vetinews/interesgeneral.php?dest=4>, (Diciembre, 2010).
78. Villareal, L., Ulloa, J., Delgado, F., 2008, "Determinación de actividad enzimática e inactivación de peroxidasa en hoja de palma", <http://www.buenastareas.com/ensayos/Determinacion-De-Actividad-Enzimatica/610243.html>, (Enero, 2011).

79. Yáñez, M., 2 006, “Análisis de las proteínas”, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, México, http://docencia.izt.uam.mx/lyanez/analisis/material_adicional/notasproteinas2.ppt, (Marzo, 2 011).
80. Zamora, N., 2 003, “Efecto de la extrusión sobre la actividad de factores antinutricionales y digestibilidad *in vitro* de proteínas y almidón en harinas de *Canavalia ensiformis*”, http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222003000300012&lng=es&nrm=iso, (Octubre, 2 010).

ANEXOS

ANEXO A

Ejemplo de cálculo de la actividad proteolítica de la tripsina y de la actividad inhibidora de la tripsina

Actividad proteolítica de la tripsina

La actividad proteolítica de la tripsina se calculó a partir de los valores de absorbancia obtenidos con el método espectrofotométrico y con el uso de la ecuación 2.1., a continuación se presenta un ejemplo del cálculo realizado.

$$AE = \frac{\Delta DO_{400}}{\Delta t} \times \frac{1\ 000 \times V_c}{\epsilon \times L \times V_e} \quad [2.1]$$

$$AE = 0,118 \times \frac{1\ 000 \times 3\ 200}{8\ 800 \times 1 \times 100} \quad [2.1]$$

$$AE = 0,429\ U/mL$$

$$AE = 429,00\ mU/mL$$

Actividad inhibidora de la tripsina

Se determinó la actividad inhibidora de un permeado o retenido inhibidor mediante la diferencia que presentó la actividad de la tripsina con la adición de este. La actividad inhibidora se determinó con un volumen de 0,60 mL de solución inhibidora por lo que a la diferencia de la actividad de la tripsina, se le multiplicó por un factor de conversión igual a 0,10 mL de solución de enzima para 0,60 mL de solución de inhibidor.

AE sin extracto de inhibidor = 383,15 U/mL de sol. enzima

AE con extracto de inhibidor = 220,00 U/mL de sol. enzima

$$\Delta AE = (383,15 - 220,00) \text{ U/mL} = 163,15 \text{ mU/mL de sol. enzima}$$

$$AI = \frac{163,15 \text{ mU}}{\text{mL de sol. enzima}} \times \frac{0,10 \text{ mL de sol. enzima}}{0,60 \text{ mL de sol. inibidora}}$$

$$AI = 27,19 \text{ mU/mL}$$

ANEXO B

Comparación de los promedios de las concentraciones proteicas obtenidas de los permeados crudos y purificados térmicamente

Se realizó una prueba de Tukey con el uso del programa estadístico MSTAT-C a partir de un análisis de varianza de un factor con el uso de la herramienta de Análisis de Datos de Microsoft Excel, con un nivel de confianza del 95 %.

En la Tabla B.1., se presentan las diferencias estadísticas que presentaron estas concentraciones obtenidas, las diferentes letras indican que existen diferencias significativas entre los valores.

Tabla B.1. Comparación de promedios de las concentraciones proteicas obtenidas de los permeados crudos y purificados térmicamente

Permeados crudos	Promedios de [P] (mg/mL)
Chocho	34,20 ^A
Arveja	10,69 ^{CD}
Fréjol	13,41 ^B
Cebada	11,51 ^C
Permeados purificados térmicamente	
Chocho	34,95 ^A
Arveja	7,59 ^F
Fréjol	9,58 ^{DE}
Cebada	8,68 ^{EF}

ANEXO C

Ejemplo de cálculo de los parámetros de evaluación de la purificación parcial de los permeados

Rendimiento en proteína (R_p) y en actividad inhibidora (R_A)

Como ejemplo, el rendimiento en proteína y en actividad inhibidora del permeado de chocho purificado con tratamiento térmico se calculó con los datos de la Tabla C.1.

Tabla C.1. Concentración de proteína y actividad inhibidora totales para el permeado de chocho sin purificación y con tratamiento térmico

Permeado	[P] total (mg)	AI total (mU)
Sin purificación	116,28	96,90
Con tratamiento térmico	80,39	50,48

Los valores de actividad inhibidora total se reemplazaron en la ecuación 1.2 para el cálculo del rendimiento en actividad.

$$R_A = \frac{\text{AI total (Purificación } n_i)(U) \times 100}{\text{AI total (Purificación } n_o)(U)} \quad [1.2]$$

$$R_A = \frac{50,48}{96,90} \times 100$$

$$R_A = 52,10 \%$$

Los valores de concentración de proteína total se reemplazaron en la ecuación 1.3 para el cálculo del rendimiento en proteína.

$$R_p = \frac{[P]\text{total (Purificación } n_i)(\text{mg}) \times 100}{[P]\text{total (Purificación } n_o)(\text{mg})} \quad [1.3]$$

$$R_p = \frac{80,39}{116,28} \times 100$$

$$R_p = 69,13 \%$$

Grado de purificación

El grado de purificación se calculó con la ecuación C.3., en la que se utilizó la actividad inhibidora específica inicial y final, es decir, después de la aplicación del método de purificación. En este ejemplo se utilizan los resultados obtenidos del permeado de chocho sin purificación y con el método de tratamiento térmico, expresados en los acápites 3.1.3. y 3.4.1.2.

$$GP = \frac{\text{AI esp (Purificación } n_i) \left(\frac{U}{mg}\right)}{\text{AI esp (Purificación } n_0) \left(\frac{U}{mg}\right)} \quad [1.4]$$

$$GP = \frac{0,628 \text{ mU/mg}}{0,833 \text{ mU/mg}}$$

$$GP = 0,75 \text{ veces}$$