

DETERMINACION CUANTITATIVA DE AMINOACIDOS PARA PROPOSITOS DE SELECCION EN FRIJOL

José Luis M. Arizmendi* y Guillermo Carrillo Castañeda**

RESUMEN

Mediante el uso de un método microbiológico para la cuantificación de aminoácidos se han determinado niveles de contenido de L-leucina, L-histidina, L-metionina en tejidos vegetales (hoja) y semilla.

La sensibilidad de este método ha permitido establecer diferencias entre cuatro variedades de frijol estudiadas.

Comparando el método microbiológico con la cuantificación de aminoácidos, utilizando el analizador de aminoácidos, se puede concluir que el primero es más rápido, sencillo, económico y de fácil aplicación como una técnica auxiliar en los programas de mejoramiento de frijol y otros cultivos.

INTRODUCCION

El frijol es un complemento importante de la dieta cotidiana y desde el punto de vista nutrimental es una de las principales fuentes de proteínas para un elevado porcentaje de la población y como cultivo ocupa el segundo lugar en importancia. Actualmente en México se siembra el 90% en temporal y el resto en riego, esto implica que puede sembrarse solo e intercalado con otros cultivos, siendo el principal el maíz.

La extensión dedicada a este cultivo es de más de 2 millones de hectáreas con una producción de 1 millón de toneladas, lo que significa en rendimiento promedio por hectárea de 500 kg; se aprecia que es uno de los más bajos rendimientos de producción por unidad de superficie, con relación a otros países.

Por otro lado, en los programas de mejoramiento es relativamente sencillo seleccionar individuos con características anatómicas y morfológicas deseadas, ya que estos caracteres resaltan a simple vista, pero al tratar de seleccionar variedades con mayor contenido de aminoácidos, es necesario auxiliarse de técnicas más complicadas en la actualidad.

* Ayudante de Investigación, Rama de Genética, Colegio de Postgraduados, SARH, Chapingo, México.

** Profesor Investigador, Rama de Genética, Colegio de Postgraduados, SARH, Chapingo, México.

Existen muchas técnicas de determinación de aminoácidos, algunas presentan ciertos inconvenientes como el utilizar mucho tiempo, el empleo de aparatos costosos o complejos, ser sofisticados, etc., de ahí nace la idea de adaptar un método microbiológico sencillo para la determinación de aminoácidos en tejidos vegetales que pueda ser aplicado en laboratorios modestos, por personas sin muchos conocimientos técnicos.

REVISION DE LITERATURA

Los métodos tradicionales de mejoramiento genético para seleccionar nuevas formas fenotípicas están basadas en el fenómeno de hibridación (6) el cual consiste en cruzar dos o más variedades, y de la progenie seleccionar aquellos individuos que reúnan las características deseadas (5). De acuerdo al método de hibridación y selección de Pedigree, tomaría según Miranda (14) de 13 a 15 años la selección de variedades.

Dado que la población humana crece aceleradamente existe por ello una gran demanda de alimentos según Borlaugh (3), por lo tanto se hace necesario seleccionar variedades con mayor contenido de proteínas (1), por lo cual los científicos tratan de crear nuevas técnicas para la solución a este problema (4, 12).

MATERIALES Y METODOS

Material Biológico. Las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo, son las siguientes:

Salmonella typhimurium LT-2, Met⁻A 54; S. typhimurium LT-2 His⁻R, proporcionadas por el Dr. Manuel V. Ortega, Centro de Investigación del IPN; Escherichia coli SB 5075, A 95 T⁺L⁻, obtenidas en el laboratorio del Dr. Ellis Englesberg, Universidad de California, Santa Bárbara, U.S.A.

Reactivos Químicos. Las sustancias químicas empleadas fueron de grado químicamente puro y adquiridas en las siguientes casas comerciales: sales inorgánicas, Baker y Merck; aminoácidos, Merck; ácidos inorgánicos, Mallinckrodt Chemical Works.

Preparación de hidrolizados

Semilla de frijol. A la semilla en seco se le quitó la testa

con pinzas de disección y el embrión, se pulverizó en un mortero. La preparación se tamizó con una malla de poro fino, obteniéndose de esta forma la harina de semilla.

Hoja de frijol. Del primer par de hojas unifoliadas desarrolladas en la plántula del frijol de 12 días de edad, se cortó una de ellas para hacer el hidrolizado. La hoja cosechada se deshidrató a peso constante en una estufa de laboratorio Curtin que se ajustó a 30°C, después se pulverizó en un mortero, obteniéndose así la harina de hoja.

Los dos tipos de harina fueron sometidos simultáneamente a peso constante (5 horas a 60°C) e inmediatamente después, de cada uno de ellos, se pesaron por duplicado muestras de 25 mg en una Balanza Analítica Mettler H5, y para las curvas patrón, se pesaron por duplicado muestras de 2.5 mg de L-histidina, L-leucina, L-metionina. Los muestreos de harina y aminoácidos fueron colocados en ampollitas de vidrio de 12 y 6 ml de capacidad para las harinas y aminoácidos respectivamente y a continuación se les agregaron 10 y 5 ml de HCL 6N, evitando la formación de grumos para tener hidrolizados homogéneos. Se sellan las ampollitas haciendo vacío con una bomba Gast 522, con la ayuda de un mechero de gas.

Las ampollitas colocadas en un desecador de vidrio Pyrex y cubiertas con agrolita, se pusieron en una estufa a 110°C durante 22 horas. Una vez transcurrido este tiempo las ampollitas se sacaron, se dejaron enfriar durante 10 minutos, se abrieron y se vertió el contenido en vasos de precipitados de 25 ml y las ampollitas se lavaron 2 veces con 2 ml de agua destilada; en el caso de las ampollitas que contenían los aminoácidos, se lavaron 2 veces con 1 ml de agua destilada, juntándose estos volúmenes con el hidrolizado respectivo.

Posteriormente el líquido fue evaporado a sequedad en baño "maría" calentándolo a 60°C en una parrilla eléctrica durante una hora, tiempo en que el ácido fue eliminado totalmente de la muestra, las soluciones de aminoácidos de las harinas fueron resuspendidas en 10 y 5 ml de medio de cultivo mínimo respectivamente, se filtraron para eliminar los residuos sólidos de la hidrólisis.

Preparación de Medios. Se utilizó un medio de cultivo mínimo.

Para la conservación de las cepas bacterianas se prepararon tubos con agar inclinado de medios suplementados con el aminoácido respectivo de acuerdo al requerimiento del microorganismo, a los cuales se les agregó agar grado bacteriológico de la casa Sigma a una concentración de 16 gramos por litro, para solidificar el medio.

En todos los casos se utilizó glucosa como fuente de carbono y energía, para lo cual se preparó una solución al 20% y se esterilizó por separado en una autoclave eléctrica a 0.7 kg/cm² durante 15 minutos; los medios de cultivo se esterilizaron a una presión de 1.05 kg/cm² durante 15 minutos y posteriormente se agregó solución azucarada para dar una concentración final de 0.4% en el medio de cultivo.

Métodos de Determinación Microbiológica

Preparación del inóculo. En matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad conteniendo 25 ml de medio de cultivo mínimo estéril y suplementado con el aminoácido correspondiente, se sembró con una asa de del inóculo y se incubaron una noche en un agitador Skinko, IKD., ajustado a una temperatura de 37°C y a 120 oscilaciones por minuto.

Al término de este tiempo, las células se lavaron para retirar los nutrientes, mediante tres períodos de centrifugación de 10 minutos cada uno a 200 rpm equivalente a 30 veces la gravedad, en una centrífuga IEC modelo HN-S (3,500 rpm equivalente a 1,500 veces la gravedad, cabezal IEC 215), al término de cada una se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en el mismo volumen, con solución salina estéril (0.85% p/v de NaCl), después de la última centrifugación las células se resuspendieron en el medio de cultivo mínimo y se ajustaron a una lectura de 0.9 de absorbencia a 660 nm. en un espectrofotómetro Coleman Junior II, Modelo 6/20.

Determinación de Aminoácidos. Para hacer la determinación de aminoácidos se prepararon medios mínimos en matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad que tienen un tubo lateral para hacer las lecturas de turbidez en el espectrofotómetro directamente, estos medios (25 ml de volumen final), contenían 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 ml de las soluciones de aminoácidos (hidrolizados de harina) o bien con

0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 de las muestras de L-histidina, L-leucina, L-metionina, previamente hidrolizados.

Los medios así preparados se sembraron con 0.5 ml de inóculo, dando una lectura de turbidez inicial de 0.04 a 0.06 de absorbencia, se incubaron en el agitador, para determinar posteriormente el grado de desarrollo (crecimiento bacteriano) alcanzado en un período de tiempo.

Siempre los experimentos se hicieron por duplicado.

RESULTADOS

El primer aspecto que se trató de determinar fue establecer los niveles de L-metionina, que podían ser cuantificados con nuestra cepa bacteriana.

Las cinéticas de crecimiento de la cepa LT-2, Met⁻A54, cuando se cultivó en el medio de cultivo basal suplementado con diferentes cantidades de L-metionina, se puede deducir de estos resultados que a las 6 ó 7.5 horas de incubación son suficientes para registrar el desarrollo de los cultivos, ya que por ejemplo una determinación realizada a las 3 horas, sólo nos podría diferenciar los cultivos que tienen L-metionina de los que no la tienen.

Cuando se creció este mismo microorganismo en medios suplementados con L-metionina, hasta 50 µg/ml se puede observar que después de un período de incubación de 7 horas y a concentraciones mayores de 25 µg/ml, ya no se producía ningún incremento del desarrollo de este mutante.

El período de incubación que se dedujo después de muchas pruebas con las cepas utilizadas en este trabajo fue igual para todas (7 horas).

Para las curvas tipo se grafica lectura de densidad óptica contra concentración del aminoácido en µg/ml.

Datos y cálculos realizados para establecer la curva tipo de metionina

$\mu\text{g/ml}$ L-met	Lectura T_0	Lectura T_f	Lectura Promedio T_f	T_f suplementados - T_f mínimo
0	0.035 0.035	0.052 0.052	0.052	0.000
2	0.035 0.035	0.200 0.190	0.195	0.143
4	0.035 0.035	0.340 0.350	0.345	0.293
6	0.035 0.035	0.420 0.380	0.400	0.348
8	0.035 0.035	0.430 0.390	0.410	0.358
10	0.035 0.035	0.460 0.400	0.430	0.378

Datos experimentales obtenidos en la determinación del aminoácido L-metionina en tejido de hoja y semilla de las variedades de frijol estudiadas

ml del prepara do hidrolizado	Volumen final del medio de cultivo	Lectura T_0	Lectura T_f	T_f suplementa- dos - T_f míni- mo	$\mu\text{g/ml}$ L-met
HC 0.8	25 ml	0.045	0.125	0.073	1.05
1.6	25 ml	0.050	0.210	0.158	2.20
HN 0.8	25 ml	0.040	0.120	0.068	0.95
1.6	25 ml	0.050	0.200	0.148	2.00
SC 0.8	25 ml	0.060	0.105	0.053	0.80
1.6	25 ml	0.060	0.160	0.108	1.50
SN 0.8	25 ml	0.050	0.090	0.030	0.40
1.6	25 ml	0.050	0.140	0.088	1.20

L-met = L-metionina

T_0 = lectura tiempo cero

T_f = lectura tiempo final del cultivo en medio mínimo o suplementado

HC = hoja de frijol variedad Canarias 107

HN = hoja de frijol variedad Negro 150

SC = semilla de frijol variedad Canarias 107

SN = semilla de frijol variedad Negro 150

Se puede concluir que siempre se observa en los resultados que existe un mayor contenido del aminoácido en hoja que en semilla en todos los casos. De los aminoácidos estudiados los valores más altos en contenido corresponden a leucina, mientras los mas bajos a metionina.

Resultados del analizador de aminoácidos. En los aminogramas podemos observar todos los aminoácidos contenidos en la muestra y el bajo contenido de L-metionina; aunque es solo apreciable en semilla, y en hoja no es determinada; la explicación a ello es que ésta se transforma en otro compuesto durante el proceso (sulfóxido de metionina) en el analizador de aminoácidos podemos concluir que el triptofano nunca se determina como tal en el analizador de aminoácidos ya que se destruye durante la hidrólisis.

Aunque aquí podemos pensar en sacar o tener el contenido de metionina haciendo la relación con otro aminoácido aunque no sea metionina, esto significa que la relación podría ser metionina-aspartico o metionina-alanina, metionina-isoleucina, etc.

DISCUSION

Se puede observar en las muestras analizadas que siempre existe un mayor contenido de L-aminácidos en hojas con respecto a la semilla y de acuerdo al análisis de los aminogramas en algunos casos, casi se encuentra el doble contenido en hoja respecto a semilla, L-metionina es el aminoácido que se encuentra en menor cantidad en los 2 tipos de tejidos.

En nuestro trabajo lo que tratamos es encontrar una técnica auxiliar de fácil aplicación en los programas de mejoramiento del frijol cosa preliminar que se logró, y que tiene como finalidad el mejoramiento de las variedades de frijol en el renglón de contenido de proteínas.

Las ventajas que tiene este método microbiológico con respecto a el método químico utilizado son:

- a) Nuestro método no tiene el grado de exactitud que tiene el método químico, sin embargo nos ha permitido establecer las variaciones en los contenidos de estos aminoácidos en las diferentes muestras analizadas, además de darnos una idea

exacta de la cantidad aprovechable del compuesto por un organismo vivo.

- b) Cantidades del orden de 0 a 25 $\mu\text{g/ml}$ de L-metionina pueden ser detectadas mediante este sistema.
- c) Nuestro método es tan sencillo que no necesita grandes conocimientos técnicos para su aplicación, esto significa que cualquier persona puede realizar esta determinación por medio de este sistema.
- d) Mientras que en nuestro sistema se pueden analizar 60 muestras simultáneamente, en un analizador de aminoácidos no se puede llevar esta misma operación a cabo.

CONCLUSIONES

El método microbiológico para cuantificar L-metionina que se describe en el presente trabajo es bastante sencillo y puede ser aplicado en programas de selección de cultivares con mayor contenido de estos compuestos, no solo L-metionina sino cualquier aminoácido como el L-triptofano que incluso no puede ser cuantificado en un analizador de aminoácidos.

BIBLIOGRAFIA

1. Aykroyd, W. R. and J. Doughty. 1964. Las leguminosas en la nutrición humana. F.A.O. Roma, Italia 1:6.
2. Bayer E., E. Gram, B. Kaltenegger and R. Uhmann. 1976. Separation of amino acids by high performance liquid chromatography. Anal. Chem. No. 48. 1106-1109.
3. Borlaug, N. E. 1974. Población humana, demanda alimenticia y necesidades de la fauna y flora. Traducciones y sobretiros No. 6:1-5 CIMMYT, México.
4. Bressoni, R., M. Flores y L. G. Elías. 1973. Aceptabilidad y valor nutricional de las plantas leguminosas de grano, en la dieta humana. El potencial de frijol y de otras leguminosas comestibles en América Latina. CIAT Cali, Colombia. 2:10.
5. Casas, D. E. 1958. Herencia de 3 caracteres morfológicos en frijol y su relación con la obtención de variedades puras. Tesis Profesional ENA, Chapingo, México. 5-20.
6. Crispín, M. A. 1960-1961. Cruzamiento natural de frijol. Agricultura Técnica de México. INIA, SAG No. 11:38-39.
7. Chang, J. Y. and E. H. Creaser. 1976. A novel manual method for protein-sequence analysis. Biochem. J. No. 157, 77-85.

8. De Candolle A. 1886. Origin of cultivated plants. 2nd. ed. London 1:6.
9. Gehrke, C. H. and Neuner, T. E. 1974. J. of de A.O.A.C. No. 57, 683-685.
10. Hill, R. L. 1965. In advances in protein chemistry. Academic Press, New York Vol. 20. 3:15.
11. Kaplon L. 1965. Archeology and domestication in American Phaseolus (Beans). Econ. Bot. 19:2-10.
12. León Vallejo Guillermo. 1959. Estudio preliminar sobre el comportamiento de diversas leguminosas tropicales en el centro de investigación "Cotaxtla", Veracruz. Tesis Profesional, ENA, Chapingo, México 1-20.
13. Madrid, C. J. 1975. Rapid and simple method for the determination of tryptofan in cereal grains. Analytical Biochemistry No. 67, 206-219.
14. Miranda C. S. 1966. Mejoramiento del frijol en México. SAG, INIA No. 3:1-10.