

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Cereales

Los cereales constituyen un conjunto de plantas de gran importancia para la humanidad, ya que son el alimento que contribuye con aporte energético y numerosos nutrientes para el organismo. Por esto los cereales han sido, son y seguirán siendo el principal sustento del hombre. Desde hace más de 24 siglos las culturas han estado estrechamente vinculadas con el cultivo y usos de los cereales; por ejemplo, el arroz ha sido el principal alimento del Medio Oriente, mientras que el mijo y el sorgo lo ha sido para países de África y algunos asiáticos. En Europa, desde las culturas más primitivas hasta las modernas sociedades de la actualidad han dependido tradicionalmente del trigo, centeno y cebada. En el nuevo mundo, el maíz es el elemento de primer orden para el desarrollo de las culturas Meso y Sudamericanas; y sigue siendo el principal y más abundante alimento para los habitantes de América Latina (Serna, 1996).

La importancia de los cereales radica en que contienen nutrientes en forma concentrada, son fáciles de almacenar, son fáciles de transportar, se conservan por mucho tiempo, se transforman con facilidad en otros alimentos y se les puede utilizar como materia prima o como producto elaborado (CAMINOLT, 2007). El cultivo de cualquier cereal es relativamente sencillo y de bajo costo. Por ello, todas las civilizaciones que han habitado el planeta han tomado a los cereales como fuente de vitaminas, minerales, proteínas, y otros nutrientes. Los principales cereales que se consumen son el trigo, el arroz, el maíz, el centeno, la cebada, la avena y el mijo.

Trigo

El trigo, como todos los cereales, pertenece a la familia de las gramíneas, la más importante del mundo desde los puntos de vista económico y ecológico, ya que la superficie de suelo que es dedicada al cultivo de las gramíneas es mayor que la suma de todas las demás especies de alimentos cultivados (Serna, 1996); por consiguiente, una deficiencia, incluso pequeña, de la cosecha de cualquiera de ellas puede provocar hambruna e inestabilidad económica en zonas muy amplias.

El trigo generalmente es transformado en harina, y ésta es destinada principalmente a la fabricación de pan, galletas, pasteles, tortillas, pastas para sopa y otros productos. Uno de los elementos nutritivos más importantes es la proteína, misma que se encuentra contenida en el gluten, el cual facilita la elaboración de levaduras de alta calidad, necesarias para la panificación. El trigo de menor calidad se utiliza para la elaboración de bebidas alcohólicas y alimentación animal. Igualmente los subproductos de la molienda (salvado, salvadillo, etc.) se utilizan como alimento forrajero, o para la elaboración de otros alimentos humanos con alto contenido de fibras.

El valor nutritivo del trigo y de los productos derivados de sus harinas, siempre han sido una fuente importante de alimento para la humanidad, ya que aportan energía, proteína, vitaminas y minerales, muy necesarios para el crecimiento sano de la población (CAMINOLT, 2007).

Los trigos pertenecen al género *Triticum*, dentro del cual se conocen 30 especies, algunas de ellas cultivables y otras silvestres. Las especies son divididas en tres subgrupos, en base al número de cromosomas de sus células reproductoras: diploide, tetraploide y hexaploide.

Producción de trigo

Según datos de la FAO, los principales países exportadores de trigo a nivel mundial son Argentina, Australia, Canadá, Estados Unidos y la comunidad Europea. La producción de trigo representa la tercera parte de los cereales sembrados a nivel mundial la producción anual de trigo a nivel global asciende a 592 millones de toneladas. China produce el 19%, Estados Unidos e India 11% cada uno, Francia y Rusia el 6% mientras que Canadá y Australia generan el 4% individualmente. En conjunto dichas naciones producen el 67%, mientras que China, Estados Unidos e India suman el 41% del total mundial. (FAO, 2005).

Según datos del INEGI (2006), para el año 2005 la producción de hectáreas cosechadas de cultivos cíclicos correspondió 18, 528,491 Ha. a nivel nacional, de las cuales 634,548 ha corresponden a las sembradas para trigo, correspondiéndole el 4.4 del total nacional.

En cuanto a la producción de trigos por Entidades Federativas a nivel nacional, el Estado de Sonora ocupa el liderazgo en producción, generando el 34.7% del total nacional. Según los datos oficiales, los principales productores de trigo para el 2005 son Sonora, Guanajuato (23.1%), Baja California (16.2) y Michoacán (6.6%) (INEGI, 2006). Históricamente, en la década del 90 al 2000, el Estado de Sonora es líder en la producción nacional con un 35% de la producción, seguida por Guanajuato (17.5%), Baja California (11.5%), Sinaloa (9.2%), Michoacán (6.4%) y Jalisco (4.4%) (INEGI, 2006).

La región noroeste del país (Sonora, Sinaloa, Baja California Norte y Sur) aportan el 55% de la producción nacional de trigo y el Bajío (Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Querétaro) el 35%.

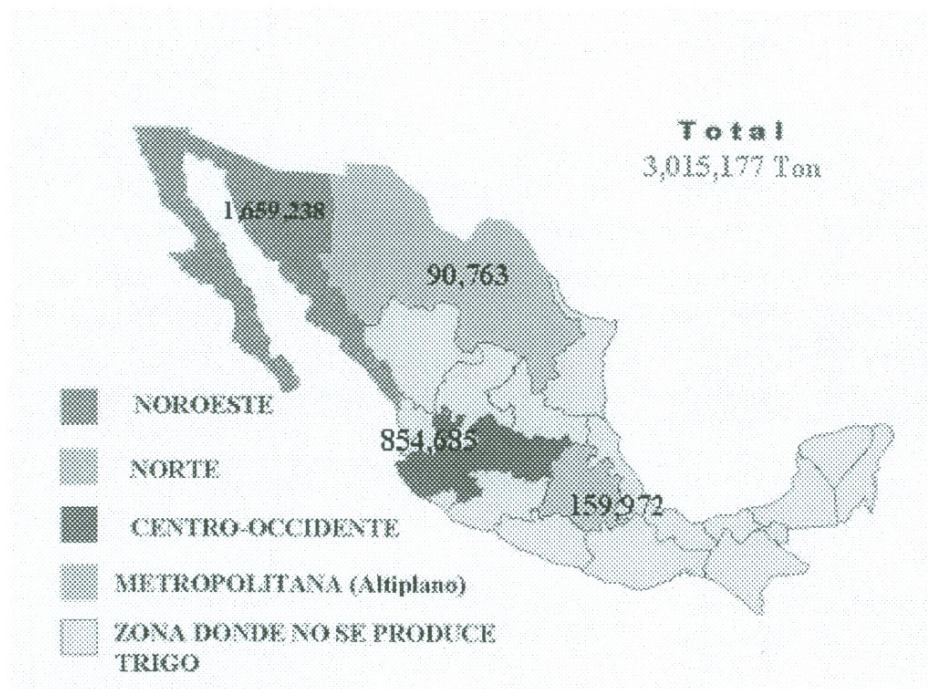


Fig. 1. Zonas y producción de trigo en México en 2005.
Fuente: CAMINOLT, 2007.

Pérdidas de granos y cereales

Se calcula que en países desarrollados las pérdidas de granos y cereales son alrededor del 10 al 15%; mientras que en otras regiones como África y Latinoamérica se llegan a alcanzar pérdidas hasta del 50% con respecto a lo cosechado (FAO, 1999).

Pérdidas de granos. Los productos de cultivos pueden perderse en cualquiera o todas las fases de la cadena alimentaria, desde la plantación hasta la preparación para el consumo inmediato. En general se han identificado tres periodos:

- a. Pérdidas anteriores a la cosecha: son las que suceden antes de que comience el proceso de recolección y pueden deberse a factores tales como insectos, malas hierbas y enfermedades que afectan a los cultivos.
- b. Pérdidas durante la cosecha: son las que se registran durante el proceso de recolección y pueden deberse, por ejemplo, a la rotura de la planta y la consiguiente separación del grano de la espiga y su derramamiento.
- c. Pérdidas poscosecha: son las que se registran en el periodo posterior a la cosecha.

Pérdida de granos poscosecha

Por el término período poscosecha se entiende al intervalo de tiempo entre la madurez del cultivo y su consumo. Por pérdida de alimentos se entiende a toda variación de disponibilidad, comestibilidad, salubridad o calidad del alimento que hace reducir su valor para el hombre; esta definición no contempla el origen de la pérdida de calidad del alimento, pero abarca cualquier restricción que impida al uso del producto para consumo humano, sin importar que posteriormente sea destinado a consumo animal. Desde un punto

de vista económico, la suma de las pérdidas en cantidad y calidad significan, inevitablemente, la pérdida de dinero, lo que repercute en el crecimiento de la producción y el beneficio al agricultor.

Dentro de los factores que se pueden contemplar que causen pérdidas de producto son: cosechas tardías; pérdidas por ataques de pájaros y otras plagas; insuficiencia de secado del grano que pueda generar ataque de hongos e insectos; grano quebrado durante el trillado; condiciones pobres de almacenamiento que causen pérdidas por hongos, insectos, roedores y otras plagas; condiciones de transporte o defectuoso empaque de grano que genere pérdida cuantitativa del producto; malas prácticas de comercialización, políticas sectoriales y aspectos socio-económicos.

Los principales agentes que causan el deterioro de los granos almacenados son:

- microorganismos (hongos, bacterias y levaduras)
- insectos y ácaros
- roedores
- pájaros

Pérdidas por Insectos. Las estimaciones de las pérdidas consiguientes varían mucho según el producto, la localidad y las prácticas de almacenamiento. Para los cereales o las leguminosas de grano de zonas tropicales, almacenados en condiciones tradicionales, puede esperarse una pérdida del 10-30 por ciento durante toda una temporada de almacenamiento (FAO, 1985).

En los productos de cultivos se encuentran muchas especies de insectos, pero son sólo unas cuantas las que producen deterioros y pérdidas. Algunas pueden ser incluso beneficiosas porque atacan a otras plagas de insectos. Es importante poder identificar exactamente las principales especies de insectos para evaluar sus efectos en el producto almacenado y establecer las medidas de control necesarias.

En México hay más de 25 especies de importancia económica que atacan a granos almacenados y sus productos. Las que mayor daño ocasionan a los granos y a las harinas, son aproximadamente 15 especies, pertenecientes a los órdenes Coleoptera y Lepidoptera (Sifuentes, 1979).

Los insectos que atacan al grano almacenado se agrupan en 2 clases de plagas: primarias y secundarias. Las primarias son aquellas que atacan al grano, se alimentan del endospermo y completan su metamorfosis en el interior del grano, ejemplos: el barrenador menor de los granos (*Rhyzopertha dominica* F.), la palomilla de los granos (*Sitotroga cerealella*), gorgojo del arroz (*Sitophilus oryza* L.), gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* M.), el gorgojo granero (*Sitophilus granarius* L.), mientras que las plagas secundarias se alimentan principalmente de las impurezas, grano dañado o tamos, del germen y de granos dañados por insectos primarios; algunos ejemplos son: el gorgojo de las harinas (*Tribolium confusum* J. y *Tribolium castaneum* H), *Tenebroides mauritanicus* L, gorgojos aserrados (*Orizaephilus surinamensis* L); estas especies son indicadores que existen plagas primarias (González, 1995).

Métodos de control de insectos de granos almacenados

Los métodos de control pueden definirse como la aplicación de prácticas y/o técnicas que tienen como objetivo fundamental abatir una población de insectos, previamente a que éstos rebasen el umbral económico de daño y su costo debe ser menor al daño económico previsto (Pacheco, 1985).

Dentro de los métodos de control de insectos se encuentran el químico, biológico, físico y mecánico, cultural, legal e integral (Morón y Terrón, 1988). Siendo el control químico y control biológico el más utilizado para el control del barrenador mayor de los granos (Markham *et al*, 1991).

Control químico. Los tratamientos con insecticidas y fumigantes son considerados como métodos de control químico. Un plaguicida se define como una sustancia o preparación química que se usa en el control o en algunos casos, para detener la acción de una plaga. Se pueden clasificar de acuerdo al organismo al que se dirige, al grupo funcional de la sustancia activa, en base a la formulación, a su presentación, entre otros (Mersch, 1985; López, 1985). Los insecticidas químicos para productos almacenados son de cuatro clases: fumigantes, preventivos, repelentes y residuales (Ouye, 1984).

La utilización indiscriminada durante décadas, han puesto en evidencia los problemas que generan, tales como: contaminación ambiental, disminución de la población de parásitos y depredadores, aparición de nuevas plagas que se consideraban secundarias, y un aumento creciente en la resistencia de los insectos a insecticidas y fumigantes (Zúñiga, 1985).

Los insecticidas más utilizados en granos almacenados y que han causado resistencia de manera intensa en algunos lugares, son el malatión, que es uno de los empleados por la alta toxicidad para los insectos y baja para el hombre; otro es el bromuro de metilo (CH₃Br), ampliamente utilizado desde 1930, es tóxico y altamente eficaz contra los insectos en estado adulto y larva, es altamente tóxico para humanos, ya que se adsorbe por la piel y pulmones; otro fumigante es la fosfina (PH₃) que se genera de tabletas de fosfuro de aluminio (Serna, 1996).

***Rhyzopertha dominica* Fab.**

(Coleoptera: Bostrichidae)

Descripción. Cuerpo de forma cilíndrica, alargado, con la parte posterior redondeada y ligeramente truncada. Posee una cabeza retráctil dentro del protórax, con antenas cuyos tres últimos segmentos son marcadamente más grandes que los demás. Cuenta con un protórax más o menos circular, rugoso, debido a la existencia de pequeñas protuberancias. Este insecto es capaz de volar. Tiene 2.5 a 3 mm de largo y un color castaño a café oscuro. Su peso promedio es de 1.4 mg (Golebiowska, 1969).

Alimento. Tanto la larva como el adulto tienen preferencia por los cereales y sus productos. El insecto causa más daño en trigo (*Triticum aestivum* L.), maíz (*Zea mais* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.) (Rees, 2004). Rara vez infesta al grano en el campo antes de la cosecha (Edde, 2006). Generalmente no se desarrolla en semillas de oleaginosas y leguminosas.

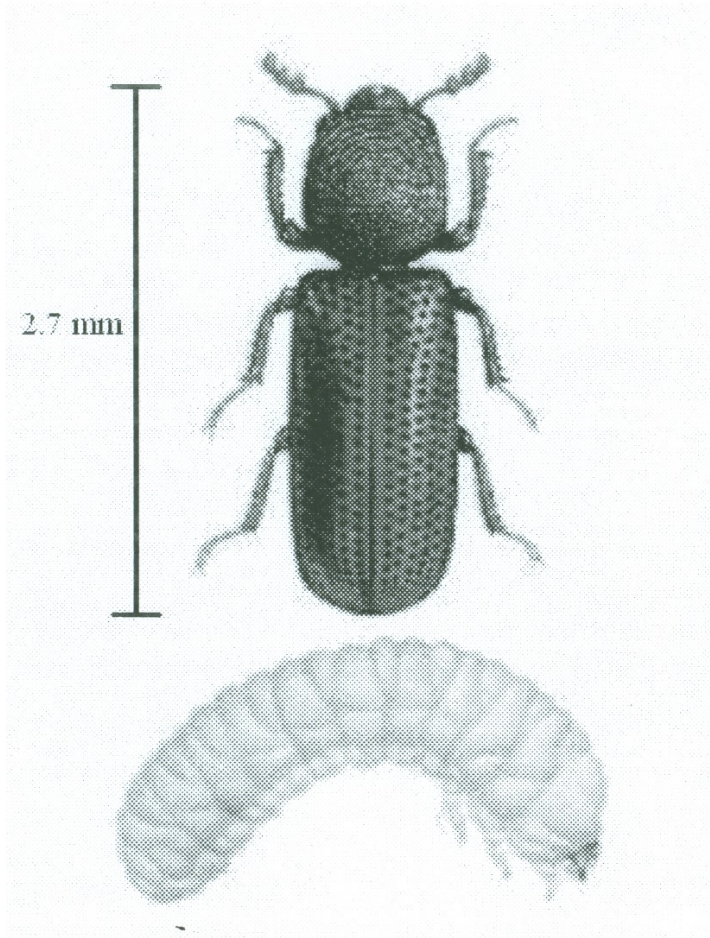


Fig. 2. Adulto y larva de *Rhyzopertha dominica* Fab.
Fuente. www.montana.edu/wwwai/imsd/vanessa/lab.html

Distribución. Actualmente *R. dominica* tiene una distribución cosmopolita y está bien establecida en las regiones templadas del mundo (Potter, 1935; Dell'Orto 1985; Fields *et al.*, 1993); se atribuye el status de cosmopolita debido a la habilidad que tiene de volar, de colonizar nuevos almacenamientos de granos y su resistencia a insecticidas (Guedes, 1990; Price, 1984). Winterbottom (1922) colectó insectos a 5 Km de distancia de una infestación fuerte (Fields *et al.*, 1993). No tiene una distribución exacta, los factores naturales dejaron de ser una barrera, ya que su distribución depende de la distribución de los granos (Guedes, 1990; Potter, 1935; Downy, 1994).

Biología. Las hembras depositan de 300 a 400 huevecillos en la superficie de los granos o entre ellos. Al emerger las larvas, que tienen patas, se abren camino hacia el interior de los granos de los cuales se alimentan y generalmente pasan la fase de pupa dentro de los granos; el estadio pupal es de 3 a 6 días, dependiendo de las condiciones ambientales, y cuando estas son adversas pueden tardar hasta 20 días (Ramírez, 1980; Davidson, 1992). El tiempo promedio desde huevo hasta la emergencia es de 45 días a 27°C (Hangstrum y Flinn, 1994). Las condiciones óptimas para su desarrollo son de 32 a 38°C y 60 a 80% de humedad relativa, sin embargo, puede sobrevivir en condiciones más calientes y secas (Rees, 1996). El adulto tiene una longevidad de 4 a 6 meses.

Importancia. El barrenador menor de los granos, *R. dominica* es una importante plaga de cereales almacenados a nivel global (Guedes, 1997). Presumiblemente es la plaga de insectos de granos de almacén más importante a nivel mundial (Longstaff, 1999). El hecho de ser la principal plaga del trigo almacenado y su proliferación se debe en parte a que la

mayoría de los embarques de trigo que se importan están infestados por este insecto. El trigo importado contiene menos del 12% de humedad, porcentaje adecuado para *Rhyzopertha dominica*, que prolifera perfectamente en granos secos. El control de *R. dominica* es complicado debido a su alta tolerancia al calor (Evans y Dermott, 1981) y su bien demostrada resistencia a la fosfina (Price, 1984).

Amilasas

El almidón sirve como alimento de reserva para las plantas, es la más importante reserva de carbohidratos de las plantas superiores. En algunos casos llega a alcanzar el 70% de la materia seca de la planta (Prasanna, 2007). Para utilizarlo, los organismos pueden tener enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos (1-4) entre los residuos α -D-glucopiranososa. Las enzimas capaces de hidrolizar al almidón son llamadas amilasas y son ampliamente producidas por plantas, bacterias y animales (Prasanna, 2005). Inicialmente el término amilasa se usó para designar a las enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos α -1,4- de la amilosa, amilopectina, glucógeno y los productos de su degradación (Bernfeld, 1955; Fisher y Stein, 1960; Myrback y Neumuller, 1950).

Clasificación de enzimas amilásicas

Las amilasas han sido clasificadas por diferentes criterios: a) por la configuración del átomo de carbono anomérico de sus productos, b) por la fuente biológica de donde proceden, c) por el tipo de ataque que efectúan, d) por la rápida caída de viscosidad del

sustrato (licuefacción), e) por una disminución de caída (sacarificación), por el tipo de producto(s) producido(s), y f) por la naturaleza de su estructura proteica.

La clasificación más antigua y más común en la designación α o β está basada en la configuración anomérica del orden de sus productos; las α -amilasas liberan productos con la configuración α -D- y la β -amilasa libera productos con la configuración β -D-. Las amilasas están divididas como endo-amilasas (α -amilasas, EC 3.2.1.1.) y exo-amilasas (β -amilasa, EC 3.2.1.2. y γ -amilasas, EC 3.2.1.3.) (Tsao *et al.*, 2004).

En 1955, la Asamblea General de la Unión Internacional de Bioquímica (actualmente IUBMB), durante su tercer congreso internacional en Bruselas, acordó crear una Comisión Internacional de Enzima, bajo la consulta de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC); dicha comisión (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature “CBN”) trabajó arduamente para conseguir una listado sistemático de enzimas; en 1977 se discontinuó el comité para crear 2 comités formales: La IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) y el “Nomenclature Committee of IUBMB” (NC-IUBMB) (IUBME, 2007). En la práctica ambos comités trabajan juntos.

En 1992 se publicó la sexta edición completa de “Nomenclatura de Enzimas”, la más actual hasta el día de hoy (pero con adiciones anuales al listado); en la cual encontramos clasificadas a las α -amilasas con el número EC.3.2.1.1; perteneciente a los clase de hidrolasas (EC. 3), subclase glucosilasas (EC. 3.2) y al grupo de las glucosidasas (EC. 3.2.1), que son las enzimas que hidrolizan a los compuestos O- y S-glucosílicos (IUBMB, 2006). Las α -amilasa son aquellas enzimas que participan en las reacciones de endohidrólisis de los enlaces 1,4- α -D-glucosídicos en polisacáridos que contengan 3 ó más

unidades de 1,4- α -D-glucosa. Esta misma comisión le asigna el nombre sistémico de 1,4- α -D-glucan glucanohidrolasa, y la reconoce bajo otros nombres comunes como: gluconasa, α amilasa, alpha amilasa, endoamilasa, Taka-amilasa A. Son enzimas que actúan sobre el almidón, glucógeno, oligo y polisacáridos similares de manera aleatoria reduciendo grupos que son liberados con una configuración α . El término α se relaciona con la configuración anomérica inicial del azúcar liberado y no la de la configuración del enlace hidrolizado.

En general las α -amilasas son endoglucosidasas, atacando glucanos en alguna parte fuera de las cadenas finales de un enlace glucosídico y produciendo una caída rápida en la viscosidad del sustrato. Las β -amilasas atacan glucanos de una manera exo en los extremos no reducidos para producir un tipo simple de producto de bajo peso molecular con una configuración β (Whistler *et al.*, 1984).

Las enzimas tienen múltiples formas, y esto se refiere a todas las proteínas que catalizan la misma reacción y que se encuentra en una sola especie. Market y Moller (1959) propusieron el término *isozimas* para describir a estas proteínas con variaciones moleculares. Este término se alterna comúnmente con el de *isoenzimas*, usados para describir proteínas con distintas formas moleculares sin indicar el origen de estas formas o las diferencias moleculares entre ellos. Sin embargo, estrictamente hablando, *isoenzimas* son aquellas enzimas pertenecientes a un grupo de enzimas que catalizan la misma reacción, pero que tienen distintas estructuras moleculares, caracterización física, propiedades bioquímicas e inmunológicas (IUPAC, 1997).

Digestión del almidón

En el metabolismo de las plantas y animales, se emplean los mismos mecanismos enzimáticos para movilizar los hidratos de carbono almacenados. En los animales, la digestión del almidón y el glucógeno empieza en la boca, con la acción de la α -amilasa que se secreta en la saliva. Esta enzima rompe los enlaces internos $\alpha(1-4)$ de ambos polímeros. En el intestino, la digestión continúa, facilitada por la α -amilasa secretada por el páncreas. Esta enzima degrada la amilasa a maltosa y un poco de glucosa. Sin embargo, sólo degrada parcialmente la amilopectina y el glucógeno, como se observa en la Fig. 3, porque no es capaz de romper los enlaces $\alpha(1-6)$ que se encuentran en los puntos de ramificación. El producto de la digestión exhaustiva de la amilopectina o del glucógeno por la α -amilasa se denomina dextrina limitante; para continuar con su degradación es necesaria la acción de una enzima desramificante, la $\alpha(1-6)$ -glucosidasa, o también llamada isomaltasa). Esta acción expone un grupo nuevo de ramificaciones con enlaces $\alpha(1-4)$, que pueden ser atacadas por la α -amilasa, hasta alcanzar una nueva serie de ramificaciones con enlaces $\alpha(1-6)$. El resultado final de la acción secuencial de estas dos enzimas es la degradación completa del almidón o del glucógeno a maltosa y algo de glucosa. La maltosa se rompe hidrolíticamente por la maltasa, dando 2 moles de glucosa, que se absorbe a continuación al torrente sanguíneo y se transporta a los diversos tejidos para su utilización (Mathews, 2004).

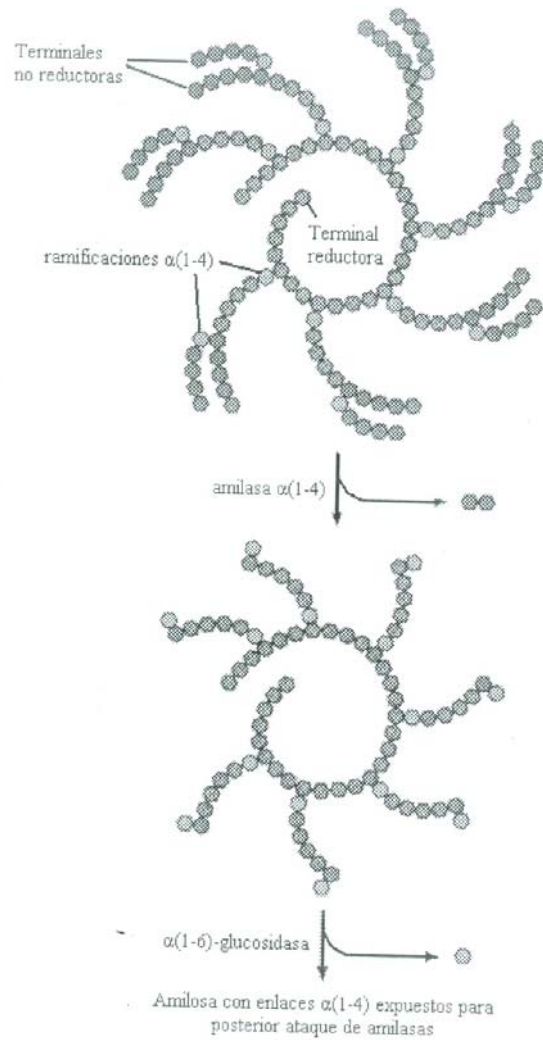


Fig. 3. Digestión secuencial de la amilopectina por acción de la α -amilasa y la $\alpha(1-6)$ -glucosidasa. La α -amilasa rompe los enlaces 1-4 entre las unidades de maltosa de la amilopectina (arriba). Sin embargo no rompe los enlaces glucosídicos 1-6 en el polímero ramificado, y se acumula una dextrina limitante (en gris), salvo que haya $\alpha(1-6)$ -glucosidasa. (abajo) La $\alpha(1-6)$ -glucosidasa rompe los puntos de ramificación, y expone el núcleo de amilasa a la posterior digestión efectuada por la amilasa.
 Fuente: Mathews, 2004.

Aplicación de enzimas α -amilásicas en la industria

Las amilasas tienen una gran importancia dentro de las aplicaciones biotecnológicas en panificación, alimentos, textiles e industria papelera (Pandey *et al.*, 2000). Las amilasas tienen aproximadamente el 25% del mercado de enzimas (Burhan *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 1998; Sidhu *et al.*, 1997); han reemplazado, casi en su totalidad, al proceso químico de hidrólisis del almidón a nivel industrial (Pandey, 2000).

Las α -amilasas (α -1,4-glucan glucano hidrolasa, EC 3.2.1.1) catalizan la endohidrólisis de los enlaces α -1,4- glucosídicos del almidón y otros oligosacáridos menores semejantes. Cada aplicación que requiera el empleo de enzimas α -amilásicas, tendrá requerimientos únicos con respecto a propiedades de estabilidad, especificidad, temperatura y dependencia del pH (Mc Tigue *et al.*, 1995). Las α -amilasas termoestables tienen muchas aplicaciones comerciales en la industria de almidones, cervecería, producción de azúcares (Leveque *et al.*, 2000), industria textil (Hendriksen *et al.*, 1999) y en proceso de manufactura de detergentes (Hewitt y Solomons, 1996, Lin *et al.*, 1998). La termoestabilidad es una característica deseable en la mayor parte de la industria de las enzimas (Asgher, 2005).

Purificación de enzimas

El primer paso de una serie de estudios dirigidos a explorar la función de una proteína es la purificación de la proteína de interés. Con anticipación se debe considerar la estabilidad de la enzima, el pH y la temperatura relativa de trabajo (Kruger, 1986). Las proteínas se pueden separar entre sí en base a su solubilidad, tamaño, carga y capacidad de

unión. Cuando se purifica una proteína, se puede determinar su secuencia de aminoácidos y su función bioquímica (Stryer, 2003).

Para poder reconocer a la proteína que buscamos, el bioquímico necesita una prueba, conocida como ensayo, que identifique alguna propiedad especial de esa proteína. Encontrar un ensayo eficaz a menudo es difícil.

Para tener más claro nuestro esquema de purificación necesitamos un elemento adicional de información: la cantidad de proteína presente en la mezcla que se ensaya. Hay varios métodos rápidos y precisos para medir la concentración proteica. Con estos dos valores determinados experimentalmente –actividad enzimática y concentración de proteína- podemos calcular la actividad específica, que es la relación entre la actividad enzimática y la cantidad de proteína en el ensayo enzimático. La actividad específica crecerá conforme se produzca la purificación y la mezcla proteica esté formada por mayor cantidad de la enzima deseada (Stryer, 2003). Esencialmente, para conseguir la purificación hace falta alcanzar un valor máximo en la actividad específica.

Una vez elegido el ensayo y el método de determinación de proteína, debemos fraccionar a la célula en sus componentes. El ensayo de fraccionamiento se desarrolla por el método de ensayo-error, basándose en experiencias anteriores. En un primer paso, se forma un homogenizado por ruptura de las membranas celulares; se fracciona la célula por centrifugación, que da lugar a un precipitado de material pesado en el fondo del tubo de centrifuga y un sobrenadante más ligero encima. El sobrenadante se centrifuga de nuevo con una fuerza centrífuga mayor obteniéndose un nuevo precipitado y otro sobrenadante. El proceso se llama centrifugación diferencial, produce fracciones de densidad decreciente, cada una de ellas con varios cientos de proteínas distintas, que se ensayan posteriormente

para obtener la actividad que se purifica. Normalmente se encuentra una fracción enriquecida en actividad, y será la fuente de material en la que se aplicarán técnicas de purificación más discriminatorias.

Se han purificado varios miles de proteínas en forma activa en base a características como solubilidad, tamaño, carga y afinidad específica de unión. El mecanismo habitual consiste en que la mezcla de proteínas se somete a diferentes separaciones cada una de ellas basada en propiedades diferentes, para obtener la proteína pura. En cada paso de la purificación se ensaya la actividad de la proteína deseada y se determina la concentración proteica. Se necesitan cantidades importantes de proteínas puras, del orden de miligramos, para esclarecer sus estructuras tridimensionales y sus mecanismos de acción. Por lo tanto, el rendimiento global es un rasgo importante en el esquema de purificación. Se pueden utilizar diversas técnicas de purificación (Stryer, 2003).

Precipitación salina

La mayoría de las proteínas son menos solubles a concentraciones elevadas de sal, un efecto llamado precipitación salina. Las concentraciones de sal en las que precipita una proteína varían de una proteína a otra; de aquí que la precipitación salina pueda utilizarse para fraccionar proteínas. Así, por ejemplo, el sulfato de amonio 0.8 M precipita al fibrinógeno, una proteína de la coagulación sanguínea, mientras que se necesita una concentración de 2.4 M para precipitar la albúmina del suero. Además, la precipitación salina es útil para concentrar disoluciones diluidas de proteínas, incluyendo las fracciones activas obtenidas en otros pasos de la purificación. Para eliminar la sal, cuando sea necesario, se puede utilizar la diálisis (Stryer, 2003).

Diálisis

Las proteínas se pueden separar de moléculas pequeñas mediante la diálisis a través de una membrana semipermeable, como puede serlo una membrana porosa de celulosa. Las moléculas con dimensiones significativamente mayores que el diámetro del poro se retienen dentro de la bolsa de diálisis, mientras que las moléculas más pequeñas y los iones atraviesan los poros de esta membrana y aparecen en el dializado fuera de la bolsa. Esta técnica es útil para retirar la sal u otras moléculas pequeñas, pero no discriminará de forma efectiva las proteínas entre sí (Lehninger, 1985).

Cromatografía de filtración en gel

Se pueden conseguir separaciones más discriminatorias, basadas en el tamaño, por medio de la técnica de cromatografía de filtración en gel. La muestra se coloca en lo alto de una columna rellena de esferas porosas compuestas de un polímero insoluble, pero altamente hidratado, tales como el dextrano o la agarosa (carbohidratos) o la poliacrilamida. Sephadex, Sepharosa y Biogel son preparaciones comerciales de estas esferas usadas normalmente, que tienen un tamaño de unos 100 μm (0.1 mm) de diámetro. Las moléculas pequeñas pueden entrar en estas esferas, pero no las grandes. El resultado es que las moléculas pequeñas se distribuyen tanto en el interior de las esferas como entre ellas, mientras que las moléculas grandes se localizan solamente en la disolución entre las esferas. Las moléculas grandes fluyen más rápidamente a través de esta columna y salen antes porque disponen de un volumen accesible menor. Las moléculas que son de un tamaño intermedio y que pueden penetrar en las esferas solo parcialmente fluirán de la

columna en una posición intermedia y las moléculas pequeñas, que siguen un camino más largo y sinuoso, saldrán últimas (Lehninger, 1985).

Cromatografía de interacción hidrofóbica

La técnica de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) es una técnica útil para la purificación y la separación de biomoléculas basándose en diferencias en la hidrofobicidad superficial. Las técnicas de cromatografía de interacción hidrofóbicas se han utilizado como parte de estrategias de purificación de proteínas, conjuntamente con otras técnicas cromatográficas tales como cromatografía de la filtración en gel y de intercambio iónico. Muchas biomoléculas, consideradas generalmente hidrofílicas, también tienen suficientes números de grupos hidrofóbicos permitiendo la interacción con los ligandos hidrofóbicos uniéndose a la matriz cromatográfica. Esta característica permite el uso de condiciones suaves de elución que nos permite mantener la actividad biológica de la muestra. La HIC es una alternativa para explotar las propiedades hidrofóbicas de las proteínas, trabajando en un ambiente más polar y menos desnaturizante. Srinivasan y Ruckenstein (1980) propusieron que la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) se debe a las fuerzas de atracción de van der Waals entre las proteínas y los ligandos inmovilizados. La base de esta teoría es que las fuerzas de van der Waals entre la proteína y el ligante se incrementan conforme la estructura ordenada del agua disminuye por el efecto salino.

La adsorción se lleva a cabo en presencia de altas concentraciones salinas, y la desorción a bajas concentraciones (Stuart, 2003). El grado de sustitución del ligante para HIC es usualmente entre 10-50 $\mu\text{moles/mL}$ de ligantes alquilos o arilos.

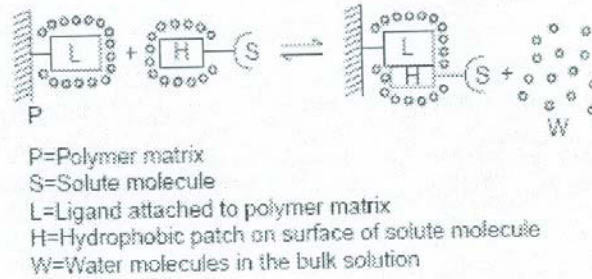


Fig. 4. Fundamento de la cromatografía de interacción hidrofóbica. Cerca de la superficie del ligante y del soluto hidrofóbico (enzima), el agua se encuentra más ordenada que en el resto de la solución y parece “blindar” al ligante y al soluto. Adicionando sal esta interacciona fuertemente con las moléculas de agua y deja menos moléculas disponibles para el “efecto de blindaje”, lo que favorece a la interacción entre la matriz y la proteína.
 Fuente: Stuart, 1993.

La fenil sefarosa CL-4B (Sigma, tamaño de particular 45-165 μm), es un medio de separación para cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). Las sustancias se separan en base a su diferencia de hidrofobicidad. El grupo fenilo está unido a una matriz de agarosa, mediante enlaces éster formando un gel hidrofóbico con propiedades no iónicas (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2002).

La fenil sefarosa CL-4B de Sigma-Aldrich P-7892, viene en forma de suspensión en etanol al 20%. El etanol reduce marcadamente la interacción hidrofóbica, por lo que es esencial lavar y remover las trazas del alcohol; esto se consigue lavando el gel con al menos 10 volúmenes de agua deionizada y decantando el sobrenadante; posteriormente se prepara la suspensión con el buffer de equilibrio. Se procede a empacar y equilibrar la columna dentro del cuarto frío a la misma temperatura en la cual se desarrollará la cromatografía. Al empacar hay que estar seguro de no queden atrapadas burbujas de aire, para lo cual el gel debe de irse adicionando de forma constante por las paredes. Una vez empacado, se debe equilibrar con al menos 2 volúmenes de buffer de equilibrio (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2002). Todas las soluciones y muestras empleadas en el proceso de cromatografía deben de estar filtradas a través de filtro de nylon Whatman de tamaño de poro 0.45 μm .

Posterior a la elución de la muestra se debe de regenerar la resina, lo cual se puede hacer con lavados de 2-3 volúmenes con una solución al 30% de isopropanol y 3 volúmenes de agua destilada, seguido de un reequilibrio de la columna con buffer de ensayo. Para garantizar la regeneración y remover algunos pigmentos fuertemente adheridos, se puede emplear secuencialmente etanol al 70%, isopropanol y urea 6 M, con su posterior lavado con agua deionizada y reequilibrio con el buffer (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2002).

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las separaciones electroforéticas se realizan casi siempre sobre geles (o sobre soportes sólidos como el papel) porque el gel sirve como tamiz molecular que potencia la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros del gel se desplazan fácilmente a través, mientras que las moléculas más grandes que los poros permanecen casi inmóviles. Las moléculas de tamaño intermedio se desplazan a través del gel con diversos grados de dificultad. La electroforesis se lleva a cabo en un bloque delgado, vertical, de poliacrilamida. La dirección del flujo es vertical descendente. Los geles de poliacrilamida, formados por la polimerización de la acrilamida entrecruzada por metilbisacrilamida, son los soportes preferidos para la electroforesis porque son inertes químicamente y se forman con facilidad. La electroforesis se diferencia de la filtración en gel en que todas las moléculas están impedidas a moverse a través de la misma matriz. El gel se comporta como una de las esferas de la columna de filtración en gel (Stryer, 2003).

La electroforesis sobre gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), es rápida, sensible y capaz de un alto grado de resolución. Cuando se tiñe con azul de Coomassie, basta 0.1 μg ($\sim 2\text{pmol}$) de una proteína para dar una banda diferenciada y, con la tinción de plata se pueden detectar cantidades aun menores ($\sim 0.02\ \mu\text{g}$). Se puede distinguir, normalmente, entre proteínas que difieren entre si aproximadamente en un 2% de sus masas (por ejemplo, entre 40 y 41 kD, lo que corresponde a una diferencia de unos 10 residuos de aminoácidos).

La eficacia de un protocolo de purificación es comúnmente llevada a cabo analizando una parte de cada fracción proteica por SDS-PAGE. Las fracciones iniciales mostrarán desde docenas hasta centenares de proteínas. Conforme progresa la purificación,

el número de bandas disminuirá y la prominencia de una de las bandas deberá aumentar. Esta banda corresponde a la proteína de interés.

Conceptos del protocolo de purificación.

Para determinar el éxito de un protocolo de purificación de proteínas, se deben utilizar los siguientes conceptos (Stryer, 2003):

Proteína total. La cantidad de proteína presente en una fracción se obtiene determinando la concentración de proteína en una alícuota de cada fracción y multiplicándola por el volumen total de la fracción.

Actividad total. La actividad enzimática de la fracción se obtiene midiendo la actividad enzimática en una alícuota de cada fracción y multiplicándola por el volumen total de cada fracción.

Actividad específica. Este parámetro se obtiene dividiendo la actividad total por la proteína total.

Rendimiento. Este parámetro es una medida de la actividad existente después de cada paso de purificación expresada como porcentaje de la actividad del extracto crudo. La actividad del extracto inicial se toma como el 100%.

Grado de purificación. Este parámetro mide el incremento de impurezas y se obtiene dividiendo la actividad específica, calculada después de cada paso de purificación, por la actividad específica del extracto inicial.

Un buen esquema de purificación tiene en cuenta tanto los niveles de purificación como el rendimiento. Un alto grado de purificación y un bajo rendimiento proporcionan poca proteína con la que experimentar. Un alto rendimiento con baja purificación deja

muchos contaminantes (proteínas diferentes de la de interés) en la fracción y complica la interpretación de los experimentos.