

DETERMINACION DE LA CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LAS PROTEINAS SOLUBLES DE LINEAS DE TABACO PARA APLICACIONES NO FUMABLES OBTENIDAS CON EL EMPLEO DE UN METODO DE PURIFICACION SIN PASOS CROMATOGRAFICOS.

Déborah Geada¹, Humberto García¹, Lexis Álvarez¹, Alberto Leyva², William Ferro², Rodolfo Valdes², Manuel Cuza¹, Sandra Vargas¹, Gretel Geada³, Alba Alvarez⁴, Alena Alonso⁴, Livia Rodríguez⁴.

- 1. Instituto de Investigaciones del Tabaco Carretera al Tumbadero Km 8 ½, San Antonio de los Baños. Habana 3500. Cuba.**
- 2. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Playa. Ciudad de la Habana. Cuba.**
- 3. Facultad de Agroforestal. Universidad de Pinar del Río. Pinar del Río. Cuba.**
- 4. Centro de Aplicaciones y Desarrollo de la Energía Nuclear. CEADEN. Calle 30, esq. 5ta Ave. Ciudad de la Habana. Cuba.**

INTRODUCCIÓN

Los cultivos agrícolas tradicionales se han procesado para la producción de alimentos con mejoras continuas. Numerosos ejemplos relacionan la extracción y purificación de las proteínas nativas de las hojas a escala comercial (Jervis y Pierpoint, 1989; Fantozzi y cols., 1993; Montanari y cols., 1993; Ares y cols., 1999). Una de las proteínas constitutivas de las plantas más estudiadas, es la Rubisco, cataliza el paso de la fijación de CO₂ en la fotosíntesis (Wildman, 2002) y se ha purificado a diferentes escalas, a partir de varios cultivos (Ares y cols., 1999). A partir del tabaco se ha obtenido en forma pura, sin color ni sabor y debido a su composición aminoacídica, posee alto valor nutricional (Wildman, 2002; Yang y cols., 2003). Además en determinadas dosis, reduce la frecuencia de hemodiálisis de pacientes nefrópatas y mejora el estado general de pacientes en coma prologado (Montanari y cols., 1993; Ares y cols., 1999).

A pesar de ello, la gran parte de los métodos de purificación de la Rubisco descritos se realizan a escala analítica y emplean pasos cromatográficos. Ello constituye una gran desventaja para potenciar el consumo de esta proteína purificada a partir de tabaco en humanos, pues el uso de cromatografías atenta contra la escalabilidad de los procesos y ofrece bajos rendimientos. Asimismo se necesita seleccionar antioxidantes rentables y eficaces para trabajar a gran escala por la inmensa cantidad de fenoles que tienen los extractos de tabaco (Leffingwell, 2001; Wagner, 1991). Estos problemas no son tan fáciles de abordar por las posibles interacciones de los aminoácidos con los polifenoles del tabaco, la difícil clarificación de los extractos de tabaco a gran escala para eliminar fibras y otros compuestos químicos y el elevado costo relativo de los antioxidantes disponibles en el mercado (Wagner, 2001).

La evaluación genotóxica de todos los compuestos que son introducidos en la sociedad resulta imprescindible, pero la gran cantidad de estos que son lanzados al mercado anualmente dificulta su total evaluación en las pruebas a largo plazo (Echols, 1990).

Es conocido que los estudios de carcinogénesis en animales son la forma más directa de detectar agentes carcinógenos. Estos ensayos presentan, sin embargo, serios inconvenientes: incertidumbre en la elección de la especie animal, alto costo económico, larga duración entre otras limitaciones que los hacen inadecuados para el escrutinio masivo de sustancias químicas. Para sortear esta dificultad los ensayos de mutagénesis en bacterias representan la primera opción en la evaluación de compuestos con actividad genotóxica, ofreciendo ventajas técnicas al requerir poco tiempo (horas o días) para su

realización y proporcionar considerable información acerca de los mecanismos moleculares de mutagénesis (Echols, 1990).

En la actualidad está bien establecido que la inducción de mutaciones puntuales en oncogenes y genes supresores provoca la aparición de tumores tanto en el hombre como en animales y son la causa de numerosas enfermedades hereditarias. Todo ello justifica que la OECD recomiende el uso de ensayos bacterianos como primer nivel de escrutinio de la actividad genotóxica de productos (Abril, 1984).

Una alternativa a los ensayos que miden mutaciones son aquellos que se basan en fusiones transcripcionales en genes SOS, dado que la mayor parte de los eventos mutacionales en bacterias están relacionados con la respuesta SOS (Echols, 1990). Estos ensayos estiman el nivel de daño primario producido en el ADN midiendo el nivel de expresión de un gen marcador, ya sea una proteína fluorescente o una enzima que en presencia de sustrato desarrolla color o bioluminiscencia. Entre estos ensayos, el SOS Chromotest (Quillardet, 1982) ha sido validado internacionalmente para la detección de carcinógenos y es muy usado para la evaluación de riesgo genético por exposición a contaminantes ambientales (Quillardet and Hofnung, 1993).

Como la Rubisco no se puede considerar parte de la dieta tradicional humana, por lo que debe realizarse su evaluación toxicológica y genotoxicológica de la misma antes de iniciar su consumo, así como después del nuevo método de purificación empleado en el artículo. Considerando todo lo anterior en el presente documento se propone un método de purificación de la Rubisco sin pasos cromatográficos y con potencialidad para ser escalado industrialmente. Asimismo, teniendo en cuenta su aplicación en humanos, se determinó su capacidad de producir citotoxicidad, a través de la disminución del porcentaje de sobrevivencia y de producir daño primario al ADN, en la cepa de *Escherichia coli* PQ-37 en presencia y ausencia de activación metabólica.

MATERIALES Y METODOS

Método de purificación de la Rubisco:

Consiste en una modificación al método de purificación de Wildman y Kwanguen en 1981. Brevemente, las hojas cosechadas (200 g) se molieron en una batidora con tampón de extracción (NaCl 2M/Na₂S₂O₅ 10 %) a 4°C y se prensaron. El material extraído se calentó con agitación en una placa de calentamiento a 50°C por 10 min y más tarde se enfrió bruscamente hasta 10°C por 15 min. Posteriormente el material se separó por centrifugación a 12 000 rpm por 10 min en una centrífuga refrigerada Jouan GP 20 22. El sobrenadante de esta centrifugación se dejó reposar durante 8 hr a 4°C. La mezcla se centrifugó más tarde a 12 000 rpm por 20 min en una centrífuga refrigerada Jouan GP 20 22. El precipitado de esta operación (FI) se resuspendió en tampón Tris-HCl 25 mM/NaCl 25 mM/5*10⁻⁴ M EDTA, pH 7.8 para la determinación de proteínas totales por Lowry y cols. (1951) y la evaluación de la pureza.

Determinación de la pureza por electroforesis en SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida con sodiododecil sulfato (SDS-PAGE) se llevó a cabo en geles con porcentaje de entrecruzamiento de 12.5 % (p/v) bajo condiciones reductoras y no reductoras según Laemmli (1970). En todos los casos se aplicaron 20 µg de proteína. La pureza se midió mediante el programa Molecular Analyst™ versión 1.4.1.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se evaluó con el método descrito por Lowry y cols. (1951). Se utilizó la Albúmina sérica bovina (SAB) en la curva patrón (intervalo: 10-500 µg mL⁻¹).

Sistema biológico

Como sistema biológico fue empleada la cepa PQ-37 de la enterobacteria *Escherichia coli* desarrollada por Huisman y D'Ari, (1981) (Huisman and D'Ari, 1981) de genotipo: (F- *thr*

leu his-4 pyrD thi galE galK or galT lac DU169 srl300::Tn10 rpoB rpsL uvrA rfa trp::Muc+ sfiA::Mud(Ap, lac)cts)

Medio de cultivo y Controles

En este trabajo fue empleado el medio Luria-Bertani (LB) (Maniatis, Fritsch E.F. and Sambrook, 1982). Se utilizó agua destilada estéril como control negativo y como positivos, 2-acetilaminofluoreno (2AF) a 2 Ng/ml como mutágeno indirecto y radiación gamma a 150 Gy como mutágeno directo. Como control de Placebo se utilizó buffer de resuspensión de la proteína del tabaco F1P (Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.2 M, EDTA 0.5 mM, pH=7.8)

Sustancia de ensayo

Fracción F1P (Rubisco): Líquido de concentración conocida de color blanquecino Olor: inodoro. Lotes: No. 2 (3ra purificación, 114,02 mg/ml). Condiciones de Almacenamiento: de 4-8°C en frascos de laboratorio.

Procedimiento de tratamiento y rango de dosis

En el desarrollo del estudio se evaluaron diferentes concentraciones de trabajo a partir de una concentración conocida y determinada por el IITabaco. La concentración de partida fue de 114.02 mg/ml y el rango evaluado fue de: 50, 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 mg/ml.

Diseño experimental

El chequeo de pureza y crecimiento del cultivo puro se realizó de acuerdo al procedimiento PT-DRB-09 del Departamento de Radiobiología del CEADEN. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: se ensayaron las concentraciones de la proteína F1P del tabaco: 50, 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 mg/ml y placebo, con y sin activación metabólica. Se realizaron tres experimentos independientes, con nueve y cuatro réplicas para el conteo de sobrevivencia y el ensayo fluorescente, respectivamente. Después de realizada la mezcla de reacción se mantuvieron los viales durante 2h a 4 °C. Se incubó 2 horas a 37 °C y posteriormente se realizaron los ensayos enzimáticos.

Evaluación de la citotoxicidad

Una vez incubadas las muestras 2h a 37 °C se tomaron 100 ml y se realizaron diluciones seriadas 1/10 en suero fisiológico al 0.85%. Luego se sembraron 100ml en placas conteniendo 20ml de LB Agar suplementado con ampicilina a una concentración final de 25 mg/ml. Se incubó 48h y se contaron las colonias en un contador de placas BIOBLOCK SCIENTIFIC 50300. Los ensayos enzimáticos se realizaron de acuerdo al procedimiento PT-DRB-09 del Departamento de Radiobiología del CEADEN.

Cálculo de la sobrevivencia

Se consideró para el cálculo del porcentaje de sobrevivencia la fórmula siguiente, según Iwanami y Oda (1985): $S = N/N_0 * 100\%$ donde: S= Sobrevivencia, N= Número de colonias del tratamiento, N_0 = Número de colonias del control negativo

Cálculo del factor de inducción (FI).

Se realizó el cálculo de la siguiente forma: $FI = (Ab-gal\ Tto / Ab-gal\ C(-)) / (APasa\ Tto / APasa\ C(-))$ donde: Aβ-gal = Actividad β-galactosidasa, APasa = Actividad Fosfatasa, Tto = Tratamiento, C (-) = Control negativo, C(+) = Control positivo.

Criterios de positividad y negatividad de la prueba

Para la citotoxicidad:

Positivo: Cuando: 1. El %S disminuye significativamente con respecto al control negativo. y 2. Existe una dependencia de la disminución del %S con la concentración del producto según el análisis estadístico.

Negativo: Cuando No se cumplan los criterios anteriores

Para la genotoxicidad:

Positivo: Cuando: 1. El FI sea mayor o igual que 2 (Kevekordes, 1999) y estadísticamente diferente del control y 2. Existe una dependencia de la concentración del producto con el aumento del FI según el análisis estadístico.

Dudoso: 1. El FI sea mayor o igual que 1,5 y menor que 2

Negativo: 1. El FI sea menor que 1,5 y 2. No se cumplen las condiciones de positividad.

Análisis estadístico

Fueron calculados los valores medios de sobrevivencia, actividad β -galactosidasa, fosfatasa alcalina y del factor de inducción SOS; y sus correspondientes desviaciones estándar para cada tratamiento. Posteriormente se comprobó la homogeneidad de varianza de los datos por medio de la prueba de Levene. Se desarrolló además un ANOVA de clasificación simple y los valores medios fueron comparados, utilizando una prueba de Scheffé con una significación del 95 %. En el análisis de correlación simple, fue calculado el coeficiente de correlación para $p < 0.05$. El programa estadístico utilizado fue el Statistica, Statsoft, 1984-2003.

RESULTADOS Y DISCUSION

En un análisis de un total de 60 artículos que relacionan métodos de purificación de la Rubisco (**Tabla 1**) se observa que los pasos más empleados para su purificación son la coagulación térmica, la precipitación ácida, la exclusión molecular y la precipitación salina. Estos datos aportan información de mucho valor para el diseño del método de purificación aspecto que no se ha tenido en cuenta en diseños anteriores. A continuación se discutirán aspectos importantes de las características de estos pasos fundamentales.

Tabla 1. Análisis de artículos y patentes de métodos de purificación de la Rubisco.

Década	#	CT	PA	PS	Extrac. Líqu-Líqu	Exclus. Mol.	Intercam. Iónico	Crom. Afin.	Ultra- centrifug.
60	1	1	1	0	0	0	0	0	0
70	16	5	5	2	0	11	1	1	1
80	15	12	9	2	0	7	1	0	3
90	15	8	8	4	6	6	2	1	3
2000-10	13	10	7	2	5	5	0	1	0
Total	60	36	30	10	11	29	4	3	7
Promedio(%)	100	60	50	17	18	48	7	5	12

La coagulación consiste en provocar un efecto de agregación o coagulante en los componentes del extracto para aglutinar pigmentos y proteínas asociadas a membranas y otros componentes celulares (Wildman y Kwanyuen, 1981). La coagulación puede ser de varios tipos. Térmica (CT) por elevación o disminución de la temperatura. Posee la ventaja adicional de que el efecto de coagulación se produce en cortos períodos de tiempo. Otros tipos son la coagulación con agentes químicos (por ejemplo Polietilenglicol), ácida o básica (en este caso es la llamada PA), por fluido supercrítico de CO₂, alcohólica y salina con (NH₄)₂SO₄ (PS) (Lu y cols., 1981; De Jong, 1984; De Jong y Saunders, 1986; Libouga y cols., 1996; Chen y Lin, 2007).

En las plantas se informa, para la purificación de las fracciones proteicas, la aplicación de tratamientos de temperatura en intervalos de 40-120°C (De Jong y Saunders, 1986; Fantozzi y cols., 1993; Garger y cols., 2000). No obstante, algunos autores recomiendan la utilización de intervalos de temperatura entre 40-60°C, para evitar la afectación estructural de las proteínas constitutivas de plantas en aminoácidos con grupos amino secundarios (Perdone y cols., 1992; Montanari y cols., 1993). El fenómeno de coagulación observado produce un jugo de color ámbar y una precipitación de hasta el 50% de las PT de los extractos vegetales (Montanari y cols., 1993; Ares y cols., 1999; Levesque y Rambourg, 2001; Wildman, 2002; Kapel y cols., 2004). El color ámbar del jugo se debe a la ocurrencia del pardeamiento enzimático y no enzimático (Chávez-Servín, 2003).

La aplicación de la precipitación ácida está dada porque la mayoría de las proteínas constitutivas tienen un pH isoelectrico entre 3.5 y 4.5 (Jervis y Pierpoint, 1989; Perdone y cols., 1992; Montanari y cols., 1993; Wildman, 2002; Kapel y cols., 2004). Al igual que en el paso de coagulación, el jugo que se obtiene es de color ámbar y en este caso en particular se remueven entre 20-50% de las proteínas restantes del extracto vegetal.

Finalmente la precipitación salina es el menos empleado de los pasos, pero su importancia es elevada cuando se requieren precipitados ricos en proteínas, por lo que su aplicación en un diseño está en gran medida definida por la escala de trabajo y las características de la preparación final (Wildman, 2002). Las proteínas constitutivas de plantas precipitan a partir del 30% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Jervis y Pierpoint, 1989; Montanari y cols., 1993).

Por lo tanto el nuevo diseño comprendió los pasos de molienda-centrifugación, coagulación térmica-centrifugación, cristalización en reposo toda la noche a 20 °C y centrifugación. Este nuevo método fue capaz de recuperar 300 mg de Rubisco de los extractos generados a partir de 200 g de biomasa de líneas de tabaco burley, con más de un 90 % de pureza. (**Figura 1**).

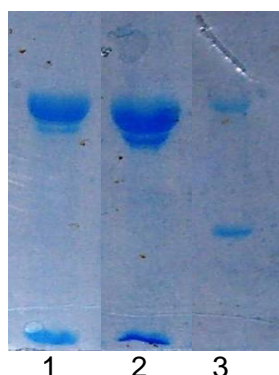


Figura 1. Electroforesis en SDS-PAGE 12.5 % con tinción de Azul Coomassie para proteínas totales. Carril 1 y 2 Rubisco de dos de los individuos utilizados en el estudio. Carril 3. Anticuerpo monoclonal CB. Hep-1.

Más tarde se realizó la evaluación citotóxica y genotóxica de la RuBisCo obtenida empleando la cepa PQ-37 de *Escherichia coli*. Para determinar si el producto de prueba tuvo acción citotóxica sobre la cepa PQ-37 de *Escherichia coli* el criterio utilizado fue la disminución estadísticamente significativa del porciento de sobrevivencia celular.

La **Tabla 2** muestra la media del porciento de sobrevivencia y su correspondiente desviación estándar tanto de la sustancia ensayada como la de los controles positivos y negativos en presencia y ausencia de activación metabólica.

Tabla 2. Valores medios del porciento de sobrevivencia y su desviación estándar en células de *Escherichia coli* PQ37 frente a diferentes concentraciones de Rubisco.

Sin activación metabólica									
	C(-)	C(+)	50	20	4	0.8	0.16	0.032	Placebo
%S (Media)	104	9	88	101	106	113	118	110	112
DE	26	2	21	25	19	23	26	16	23
Nivel Signif.	-	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Con activación metabólica									
	C(-)	C(+)	50	20	4	0.8	0.16	0.032	Placebo
%S (Media)	95	0.47	115	96	118	122	140	126	107
DE	33	0.13	24	27	34	31	26	24	34
Nivel Signif.	-	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

El criterio de citotoxicidad considerado fue una disminución significativa del porcentaje de sobrevivencia de la cepa *E.coli* PQ37 con respecto al control negativo frente a las diferentes concentraciones de Rubisco. Este estudio indicó que ninguna de las concentraciones evaluadas disminuyó el porcentaje de sobrevivencia celular ni en ausencia ni en presencia de activación metabólica. Además no existió una dependencia del porcentaje de sobrevivencia con el aumento de la concentración ni en ausencia ni en presencia de activación metabólica ($r=-0.51$, $r=-0.64$; $p<0.05$ respectivamente). En el caso del estudio de genotoxicidad, para determinar si la Rubisco tiene acción genotóxica sobre la cepa PQ 37 de *Escherichia coli* el criterio de genotoxicidad utilizado fue el Factor de Inducción SOS (FI) según lo indicado por Quillardet *et al.*, (1989). La **Tabla 3** muestra la media del factor de inducción y su correspondiente desviación estándar tanto de la proteína ensayada como la de los controles positivos y negativos en presencia y ausencia de activación metabólica.

Tabla 3. Valores medios obtenidos del Factor de inducción y su desviación estándar en las células de *Escherichia coli* PQ37 frente a diferentes concentraciones de la Rubisco.

Sin activación metabólica									
	C(-)	C(+)	50	20	4	0.8	0.16	0.032	Placebo
% FI (Media)	1	7.7	1.0	1.0	1.1	0.7	1.0	1.2	1.1
DE	0	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3
Nivel Signif.	-	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Con activación metabólica									
	C(-)	C(+)	50	20	4	0.8	0.16	0.032	Placebo
% FI (Media)	1	3.0	0.9	0.8	1.0	1.0	1.0	0.9	1.1
DE	0	0.3	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0
Nivel Signif.	-	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Los resultados mostraron que la Rubisco de tabaco no indujo daño primario en el ADN para ninguna de las concentraciones ensayadas en las condiciones experimentales utilizadas (Tabla 3). Ninguna de estas concentraciones duplicó el factor de inducción respecto al control negativo ni este indicador dependió de la concentración, siendo no significativos los coeficientes de correlación ($r=0.48$ y $r=0.47$) en presencia y ausencia de activación metabólica, respectivamente. Lo anteriormente expuesto es indicativo de no genotoxicidad para estas concentraciones.

La ausencia de genotoxicidad ni citotoxicidad en las concentraciones evaluadas obtenida en las células de *E. coli* están en correspondencia con la evaluación mutagénica de la fracción F1P utilizando el test de Ames, donde los resultados fueron igualmente negativos (Chiesara *et al.*, 1989). De igual forma, cuando fueron alimentadas las ratas con la proteína F1P y luego evaluada la orina mediante el test de Ames los resultados fueron negativos (Renner y Munzner, 1989).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que, en las condiciones evaluadas de ensayo, la Rubisco de tabaco no resultó citotóxica ni genotóxica. La curva dosis–efecto del producto no mostró una dependencia de la concentración, siendo no significativos los valores del coeficiente de correlación en las condiciones experimentales ensayadas

RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar el efecto genotóxico a otros niveles de expresión del daño genético como mutación génica.

BIBLIOGRAFIA

1. Abril.; Jurado, J; Evaluación mutagénica en bacterias: El ara de mutaciones directas. **(1): 15-37, 1984.**
2. Ares, D; H. Garcia; S. Naranjo; I. Pelaez. Caracterización parcial de las fracciones proteicas extraídas de las hojas de tabaco. **Cubatabaco. Ciencia y Técnica 1 (1):55-61, 1999.**
3. Bartholomew, T. A. Effect of plant population on biomass and protein production of tobacco grown for protein. **M.S. Tesis.** North Carolina State University, Raleigh, **1986.**
4. Chávez-Servín, JL. Estudios de estabilidad en preparados de base láctea suplementados con diferentes fuentes de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. **Tesis** en opción al grado científico de Doctor en Ciencias en Medicamentos, Alimentación y Salud en la Universidad de Barcelona, **2003.**
5. De Jong, E. Factors related to maximization of protein extraction from green leaves of tobacco *Nicotiana tabacum* L. **Current Trends in Life Sciences. XI: 9-20, 1984.**
6. De Jong, E.; Saunders, P. Fluctuations in protein levels of tobacco leaves and consequences for extractability. **Contributions to Tobacco Research. 13(3): 139-149, 1986.**
7. Echols, H. and Goodman, M.F. Mutation induced by DNA damage: a many protein affair. **Mutation Research. 236:301-311, 1990.**
8. Ershoff, B. H., S. G. Wildman, and P. Kwanyuen. Biological evaluation of crystalline fraction I protein from tobacco. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 157:626-630, 1978.**
9. Fantozzi, P.; Rossi, M.; Schiraldi, A.; Montanari, L. Removal of nicotine from tobacco leaf protein by supercritical CO₂. **Italian Journal of Food Science. (4): 333-339, 1993.**
10. Garger, S.J.; Holtz, R.B.; McCulloch, M.J.; Turpen, T.H. **Patente:** Process for isolating and purifying viruses, soluble proteins and peptides from plant sources. **US. 6 033 895, 2000.**
11. Huisman, O. and D'Ari, R. An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in *Escherichia coli*. **Nature 290:797-799, 1981.**
12. Iwanami, S. and Oda, N. Theory of survival of bacteria exposed to ionizing radiation. **Rad. Res. 102: 46-58, 1985.**
13. Jervis, L.; Pierpoint, W.S. Purification technologies from plant proteins. **Journal of Biotechnology. 11: 161-198, 1989.**
14. Kapel, R.; Olstern, P.; Gollongner, D.; Linares, E.; Rambourg, J. Hydrolysats des proteines blanches de la luzerne. **Patente. FR 2876389-A1, 2004.**
15. Kevekordes, S., Mersch-Sunderman, S.V., Burghaus, C.M., Spielberg, J., Schmeiser, H.H., Artl, V.M. and Dunkeberg, H. SOS induction of select naturally occurring substances in *Escherichia coli* (SOS Chromotest). **Mutation Research 445: 81-91, 1999.**
16. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature. 227: 680-685, 1970.**
17. Leffingwell, J.C. Chapter 8. Leaf chemistry. **Tobacco: production, chemistry and technology.** World Agricultural Series. Blackweel Sciences ed: **265-284, 2001.**
18. Levesque, D.; Rambourg, J.C. **Patente:** Procédé pour traiter le jus vert issu du pressage d'une matière foliaire riche en protéines telle que la Luzerne. **FR. 2819 685-A1, 2001.**
19. Libouga, D.; Aguié-Beghin, V.; Dowillard, R. Thermal denaturalization and gelation of Rubisco: effects of pH and ions. **International Journal of Biological Macromolecules. 19: 271-277, 1996.**
20. Long, R. C. Edible tobacco protein: Moving beyond theory. **Crops Soils Mag. 36:13-15, 1984.**

21. Lowry, D. H., Rosebroug, N. J., Farr, A. L., Randal, R. Protein measurement with foling phenol reagent. **Journal Biology Chemical.** **193: 256-269, 1951.**
22. Lu, C.; Jorgensen, N.; Straub, R.; Koegel, R. Quality of alfalfa protein concentrates with changes in processing conditions during coagulation. **Journal of Diary Science.** **64: 1561-1570, 1981.**
23. Maniatis, T., Fritsch E.F. and Sambrook J. Molecular cloning, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor , New York, **1982.**
24. Montanari, L.; Fantozzi, P.; Pedone, S. Tobacco fraction I protein (FIP) utilization for oral or enteral feeding of patients. 1. Heavy metal evaluation. **Lebensm.-Wiss. U-Technol.** **26: 259-263, 1993.**
25. Perdone, S.; Salvaggini, R.; Fantozzi, P. Leaf protein availability in foods: significance of the binding of polyphenolic compounds of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. **Lebensmittel-Weissenschaft-Technologie.** **28 (6): 625-634, 1995.**
26. Pirie, N. W. Leaf protein: A beneficiary of tribulation. **Nature** **253:239-241, 1975.**
27. Quillardet P., Huisman O., D'Ari R. and Hofnung M. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS funtion in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **79:5971-5975, 1982.**
28. Quillardet, P. and M. Hofnung. The SOS Chromotest. **Mutation Research** **279: 235-279, 1993.**
29. Quillardet, P., G. Frelat, V. D. Nguyen and M. Hofnung. Detection of ionizing radiations with the SOS Chromotest, a bacterial short-term test for genotoxic agents. **Mutation Research** **216: 251-257, 1989.**
30. **Regulación No 39/04.** Principios de las buenas prácticas de laboratorio no clínico de seguridad sanitaria y medioambiental. República de Cuba, Ministerio de Salud Pública, Buró Regulatorio para la protección de la salud pública. **2004**
31. Sheen, S. J. and V. T. Sheen. Effect of chemical and enzymatic degradation on the functional properties of fraction-1-protein. **J. Agric. Food Chem.** **36:445-450, 1988.**
32. Sheen, S. J. and Vera L. Sheen. Functional properties of fraction 1 protein from tobacco leaf. **J. Agric. Food Chem.** **33:79-83, 1985**
33. Sheen, S. J. and Volney L. Sheen. Characteristics of fraction-1-protein degradation by chemical and enzymatic treatments. **J. Agric. Food Chem.** **35:948-952, 1987.**
34. Sheen, S. J. Comparison of chemical and functional properties of soluble leaf proteins from four plant species. **J. Agric. Food Chem.** **39:681-685, 1991.**
35. Wagner, G. Chapter 8C. Leaf surface chemistry. **Tobacco: production, chemistry and technology.** World Agricultural Series. Blackweel Sciences ed: **284-290, 2001.**
36. Wildman, S. Along the trail from Fraction I protein to Rubisco (ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase). **Photosynthesis Research.** **73: 243-250, 2002.**
37. Wildman, S. G. Tobacco a potential food crop. **Crops Soils Mag.** **31:7-9, 1979.**
38. Wildman, S. G., P. Kwanyuen, and B. H. Ershoff. Production and biological evaluation **Proceedings of a grantee-users conference held October 18-20, 1977** at the University of Wisconsin-Madison. National Science Foundation: Washington, DC.
39. Wildman, S.; Kwanyuen, P. Procédé pour extraire la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase d'une matière végétale. **Patente France.** **81 09950, 1981.**
40. Yang, Sh.; Kawamura, Y.; Yoshikawa, M. Effect of Rubiscolin, a δ -opiod peptide derived from Rubisco, on memory consolidation. **Peptides.** **24: 325-328, 2003.**