

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL GRANO MOLIDO Y LA TORTA DE SOYA DESGRASADA (*Glycine max*, Merr; VAR. INCA SOY 24) QUE SE EMPLEAN EN EL MEDIO DE CULTIVO PARA *Bradyrhizobium elkanii*

Aida T. Rodríguez✉, María C. Nápoles, M. A. Ramírez, Yamilet Gutiérrez y Daimy Costales

ABSTRACT. Some soybean derivatives have been used as culture medium for *Bradyrhizobium*. A positive effect on the growth dynamics of these microorganisms and an inducing power on the expression of gene nodulation has been demonstrated. This work was carried out in the Crop Physiology and Biochemistry Department from the National Institute of Agricultural Sciences (INCA), where the chemical characterization of the ground grain and the fat-free soybean cake was done. The phytochemical analyses were carried out and proteins as well as reducing carbohydrates were later quantified. Three successive extractions with solvents of growing polarity were carried out. Presence of triterpenes, steroids, quinones, lactonic groups, aminoacids, amines, lipids, oils, reducing carbohydrates, mucilages, flavonoids and proteins was observed in both materials. The quantification of proteins and reducing carbohydrates showed that ground grain has a higher concentration of these two compounds than the fat-free soybean cake.

Key words: soybean, *Bradyrhizobium*, chemical composition

RESUMEN. Algunos derivados de la soya se han utilizado como medio de cultivo para *Bradyrhizobium*, demostrándose su efecto positivo sobre la dinámica de crecimiento de estos microorganismos, así como su poder inductor sobre la expresión de los genes de nodulación. El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), donde se realizó la caracterización química del grano molido y la torta desgrasada de soya, a los cuales se les realizaron tres extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente. Se realizó el correspondiente tamizaje fitoquímico y posteriormente se cuantificaron las proteínas y los carbohidratos reductores. Se observó en ambos materiales la presencia de triterpenos, esteroides, quinonas, agrupamientos lactónicos, aminoácidos, aminas, lípidos, aceites, carbohidratos reductores, mucílagos, flavonoides y proteínas. La cuantificación de proteínas y carbohidratos reductores evidenció que el grano molido exhibe mayor concentración de ambos compuestos que la torta desgrasada.

Palabras clave: soja, *Bradyrhizobium*, composición química

INTRODUCCIÓN

La soya constituye el hospedero específico para *Bradyrhizobium* (1) y los compuestos que aporta, además de ejercer un papel en la nutrición y el quimiotaxis de estas bacterias, desempeñan un papel esencial en el éxito de la simbiosis (2, 3). La exudación de flavonoides en sus semillas y raíces constituye la primera señal en el complejo intercambio de señales moleculares que tienen lugar entre el *Rhizobium* y la leguminosa huésped. La daidzeína y la genisteína son particularmente

isoflavonoides que se encuentran en concentraciones biológicamente relevantes en las semillas y raíces de la soya; además, constituyen los inductores más potentes de los genes de nodulación para *Bradyrhizobium japonicum*. Adicionalmente, se demostró que los derivados glicosilados de estos isoflavonoides también son compuestos que actúan sinérgicamente en la inducción de la nodulación.

Además de los flavonoides, en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa la planta libera varios metabolitos secundarios, entre ellos: aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares, los que se consideran importantes quimioatrayentes para los microsimbiontes (4, 5).

El efecto positivo de la soya sobre la quimiotaxis, nutrición y expresión de los genes de nodulación en *Bradyrhizobium* generó recientemente una patente que ampara su utilización en medios de cultivo para *Bradyrhizobium japonicum*, debido a que es más barato, accesible y constituye un paso de avance en la obten-

Ms.C. Aida T. Rodríguez, Investigadora y Ms.C. M. A. Ramírez, Investigador Agregado de la Estación Experimental del Arroz "Los Palacios"; Dra.C. María C. Nápoles, Investigadora Auxiliar y Daimy Costales, Reserva Científica del Grupo de Productos Bioactivos, Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700; Ms.C. Yamilet Gutiérrez, Investigador Agregado del Instituto de Farmacia y Alimento (IFAL).

✉ atania@inca.edu.cu

ción de biopreparados más eficientes. Se demostró que los medios que contienen la soya en su composición química incrementan la multiplicación celular, la producción de factores Nod, la nodulación y los rendimientos del cultivo (6).

En diferentes estudios llevados a cabo con la cepa *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001, se comprobó que derivados como el grano molido y la torta de soya desgrasada, ejercen un efecto diferenciado tanto en la dinámica de crecimiento celular como en la expresión de los genes de nodulación.

Resulta lógico pensar que diferencias en la composición química de estos derivados pudieran explicar el comportamiento diferenciado en la actividad biológica. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar la composición química del grano molido y la torta de soya desgrasada (*Glycine max*, Merr; var. INCA soy 24) empleadas como componentes del medio de cultivo *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizó grano molido y torta desgrasada de soya (*Glycine max*, Merr; var. INCA soy 24) como material vegetal.

Las semillas de soya empleadas se cosecharon en la primavera del 2000 en un suelo Ferralítico Rojo lixiviado típico Eútrico (7) y se almacenaron a una temperatura de 4°C.

Preparación y extracción del material vegetal para el análisis fotoquímico. El esquema de tamizaje más adecuado para este análisis es la extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente, con la finalidad de lograr un mayor agotamiento del material vegetal. Todas las extracciones se realizaron a temperatura ambiente (5).

Para ello, se tomaron 5 g de cada material vegetal y se le añadieron 50 mL de n-hexano. Se maceraron las muestras durante siete días a temperatura ambiente, posteriormente se filtraron y se obtuvieron los extractos n-hexánicos. A los residuos se les adicionó 50 mL de etanol, se maceraron durante otros siete días, se filtraron y se obtuvieron así los extractos etanólicos. Finalmente, a estos residuos se les adicionaron 50 mL de agua, se maceraron durante otros siete días y se filtraron obteniéndose los extractos acuosos.

El experimento se realizó tres veces en el año con tres réplicas y los resultados fueron coincidentes. Para el análisis estadístico se trabajó con la media de los tres muestreos.

Tamizaje cualitativo preliminar. Para realizar este análisis químico cualitativo (por cambio de coloración) de los diferentes extractos, se siguió la metodología descrita para plantas medicinales (5), ensayándose en cada extracto los metabolitos que de acuerdo con la solubilidad pudieran extraerse con estos solventes.

Análisis cuantitativo de carbohidratos reductores y proteínas. Se realizaron los análisis cuantitativos de

carbohidratos reductores (8) y las proteínas (9) a los extractos etanólicos y acuosos tanto del grano molido como de la torta desgrasada, mediante métodos colorimétricos utilizando un espectrofotómetro Spekol 11 UV/Visible.

Los datos se procesaron mediante un arreglo bifactorial con un diseño completamente aleatorizado y las medias se docimaron por la prueba de Rangos Múltiples de Duncan con un 5 % de significación. Para ambas determinaciones uno de los factores fue el tipo de extracto (nivel 1: extracto acuoso y nivel 2: extracto alcohólico) y el otro factor fue el derivado de la soya (nivel 1: grano molido y nivel 2: torta desgrasada).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tamizaje cualitativo preliminar. De forma general, se puede señalar que la soya contiene varios metabolitos importantes, los que le confieren un alto valor nutricional para animales y humanos, dado particularmente por la elevada concentración de azúcares, lípidos, aceites, aminoácidos y proteínas (10, 11, 12, 13).

Muchos de estos compuestos participan además activamente en la quimioatracción de microorganismos beneficiosos del suelo, como son los aminoácidos y azúcares, confiriéndoles una mayor competitividad en la lucha por el nicho ecológico. Los resultados se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Tamizaje fitoquímico de los diferentes extractos en ambos materiales vegetales

Extractos	Compuestos	Material vegetal	
		Grano molido	Torta desgrasada
n-Hexánico	Alcaloides	-	-
	Triterpenos y esteroides	++	+
	Quinonas	+	+
	Agrupamientos lactónicos	+	+
	Lípidos y/o aceites	++	+
Etanólico	Azúcares reductores	++	+
	Agrupamientos lactónicos	++	+
	Saponinas	-	-
	Fenoles y/o taninos	-	-
	Aminoácidos y aminos	++	++
	Alcaloides	-	-
	Flavonoides	++	+
Acuoso	Cardiotónicos	-	-
	Quinonas	-	-
	Saponinas	++	+
	Alcaloides	-	-
	Fenoles y/o taninos	-	-
	Azúcares reductores	++	++
	Flavonoides	-	-
Mucílagos	++	+	

+ Ligera presencia

++ Fuerte presencia

- Ausencia

Se observó en el grano molido una mayor presencia de los compuestos triterpenos y esteroides, lípidos, azúcares reductores, agrupamientos lactónicos (coumarinas), flavonoides, saponinas y mucílagos que en la torta desgrasada. Sin embargo, la presencia de aminoácidos y aminos fue muy fuerte en ambos materiales vegetales,

lo cual pudo apreciarse por la intensidad del color mostrada al realizar el ensayo. En cambio, no se detectaron alcaloides, glucósidos cardiotónicos, fenoles y/o taninos.

En cuanto al extracto n-hexánico en ambos materiales vegetales, el ensayo de alcaloides resultó negativo y hubo una elevada detección en el grano molido de triterpenos y esteroides, compuestos que son precursores de los aceites esenciales y parte de las hormonas y vitaminas, respectivamente. La intensa coloración observada en el ensayo para lípidos y/o aceites en el grano molido, permitió comprobar la fuerte presencia de estos compuestos resultados que coincide con algunos trabajos (10) que plantean que la soya es un alimento de alto contenido en grasa (entre 18 y 21 %), no siendo así en el caso de la torta desgrasada que disminuyó como es lógico su contenido.

En el caso del extracto etanólico, donde se encuentran los compuestos de baja polaridad del grano molido, se observó una elevada presencia de reductores, coumarinas y aminas. Estas últimas se encuentran en gran cantidad unidas a compuestos orgánicos a los que muchas veces le confieren su actividad fisiológica (11), además de la fuerte presencia en este extracto de aminoácidos que forman las proteínas, moléculas que se encuentran entre 38 y 40 % en el vegetal (11, 12). También se observó una alta concentración de flavonoides, compuestos que precisamente son los que se encuentran, fundamentalmente, en las leguminosas con un importante papel en la simbiosis (12, 13), que pudo ser detectado por la fuerte coloración mostrada en el ensayo. Sin embargo, en el extracto etanólico de la torta se encontraron los mismos compuestos pero con una coloración menos intensa, excepto las aminas y/o aminoácidos que también se encontraron en una elevada concentración. Por otro lado, no se detectó la presencia de compuestos antimicrobianos como son los fenoles y/o taninos, alcaloides, glucósidos cardiotónicos y saponinas (8).

Por su parte, el extracto acuoso para el grano molido demostró una elevada presencia de compuestos con mediana y alta polaridad, en el caso de las saponinas, carbohidratos reductores y mucílagos, mientras que en el mismo extracto pero de la torta desgrasada hubo una baja detección de estos compuestos. Por otra parte, no se observó en ninguno de los dos extractos alcaloides, fenoles y/o taninos y flavonoides.

Análisis cuantitativo de carbohidratos reductores y proteínas. Una vez realizados los ensayos de identificación, se cuantificaron los carbohidratos reductores y las proteínas en aquellos extractos donde fue identificada su presencia, dada la importancia de estos compuestos en la quimioatracción de las bacterias beneficiosas (4), además del papel esencial que desempeñan en la nutrición (Tabla II).

Tabla II. Cuantificación de carbohidratos reductores y proteínas en los materiales vegetales estudiados

Material vegetal	Extracto	Contenido de proteínas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Contenido de carbohidratos reductores ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Grano molido	Etanólico	2807.40 d	250.77 b
	Acuoso	5768.50 a	474.85 a
Torta desgrasada	Etanólico	2991.83 c	66.51 d
	Acuoso	3104.54 b	246.99 c
Error Estándar		0.04	0.01
(p < 0.01)			

Los resultados tanto de proteínas como azúcares reductores mostraron interacción entre los factores, los cuales pueden observarse en la tabla.

También puede apreciarse una marcada diferencia en el contenido de proteínas y carbohidratos reductores, en ambos extractos, tanto en el grano molido como en la torta desgrasada, corroborándose así la fuerte presencia de estos en el análisis cualitativo. Además, este resultado puede ser una de las causas del comportamiento diferenciado que se presenta entre ambas variantes de soya sobre el crecimiento de *Bradyrhizobium*, a favor del grano molido, pues ambos compuestos son considerados importantes quimioatrayentes (4, 5). Por otra parte, se confirma que estos compuestos se extraen mejor en agua que en etanol.

Algunos autores (4) demostraron la posibilidad de emplear la torta de soya como componente del medio de cultivo para *Bradyrhizobium* y posteriormente (resultados no publicados) trabajos realizados con el grano molido revelaron de igual forma una influencia positiva sobre la dinámica de crecimiento celular de estas bacterias. Ambos derivados, por ende, garantizan algunos de los compuestos nutricionales de este microorganismo, lo que se explica ahora con los resultados de este trabajo.

Con este estudio se demostró, desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, que la mayor expresión de genes y la consecuente producción de factores de nodulación del grano molido respecto a la torta desgrasada, pudiera ser debido a la diferencia en cuanto a la presencia de los compuestos relacionados con la simbiosis, como son los flavonoides, aminoácidos y azúcares.

REFERENCIAS

1. Long, S. Genes and signals in the Rhizobium-legume symbiosis. *J. Plant Physiol.*, 2001, vol. 125, p. 69-72.
2. Nápoles, M. C.; Cabrera, J. C.; Laeremans, T. y Vanderleyden, J. The analysis of nodulation factors as a tool in the design of new culture media for *Bradyrhizobium japonicum*. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 2, p. 79-81.
3. Oke, V. y Long, S. R. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999, vol. 2, p. 641-646.

4. Nápoles, M. C.; Gutiérrez, A. y Varela, M. Quimiotaxis de *Bradyrhizobium japonicum* ICA 8001 hacia ácidos orgánicos y exudados de semillas de soya. *Cultivos Tropicales*, 1998, vol. 19, no. 2, p. 27-29.
5. Guía metodológica para plantas medicinales. Dirección de Ciencia y Técnica, 1997.
6. Patente No. 22797. Concedido por resolución No. 556/2002. OCPI. Cuba.
7. Hernández A. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos de Cuba, 1999, 64p.
8. Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. *J. Biol.Chem.*, 1944, vol. 153, p. 375-380.
9. Sun, S. MicroLowry in methods in plant molecular agricultural biotechnology. Asian Vegetable Research and Development Center, Council of Agriculture, 1994, p. 9-11.
10. Careri M.; Mangia A.; Musci, M. Overview of the applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: naturally occurring substances in food. *Journal of Chromatography*, 1998, vol. 794, p. 263-297.
11. Gutiérrez, Y.; Rodríguez, A. T. y Miranda, M. Validación de dos técnicas espectrofotométricas para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en la hoja de guayaba (*Psidium guajava*, L.). *Revista Cubana de Farmacia*, 2000, vol. 34, no. 1, p. 24-26.
12. Dixon, R. A.; Howles, P. A.; Lamb, C.; He, X. Z. y Reddy, J. T. Prospects for the metabolic engineering of bioactive flavonoids and related phenylpropanoid compounds. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1998, vol. 439, p. 55-66.
13. Vetten, N.; Horst, J. ter; Schaik, H. P. van; Boer, A. de; Mol, J. y Koes, R. A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3', 5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, vol. 96, p. 778-783.

Recibido: 22 de octubre de 2002

Aceptado: 12 de septiembre de 2003

CURSOS DE POSGRADO

Precio: 250 USD

Producción de café orgánico

Coordinador: Dr.C. Francisco Soto Carreño

Fecha: a la medida

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 6-3773
Fax: (53) (64) 6-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu