

**COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE FRACCIONES
PROTEÍNICAS AISLADAS DEL FRIJOL COMUN
(*Phaseolus vulgaris*)¹**

**Roberto A. Gómez-Brenes², Elena Isabel Núñez³,
Ricardo Bressani⁴ y J. Edgar Brabam²**

**Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP),
Guatemala, Guatemala, C. A.**

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como propósito evaluar el comportamiento biológico de fracciones proteínicas aisladas del frijol mediante extracción secuencial con diferentes solventes.

Manuscrito modificado recibido: 22-7-83.

- 1 Este trabajo se llevó a cabo con fondos de la Research Corporation, New York, N. Y. (Subvención INCAP PN-740).
- 2 Científicos de la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Apartado Postal 1188, Guatemala, Guatemala, C. A.
- 3 Este trabajo se basa parcialmente en la tesis de graduación de la Licda. Núñez (*Magister Scientifical* en Ciencias y Tecnología de Alimentos), del Centro de Estudios Superiores en Nutrición y Ciencias de Alimentos (CESNA), Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia/INCAP.
- 4 Jefe de la citada División.

Publicación INCAP E-1114.

Con el fin de obtener el material para ensayo biológico, se realizó una extracción fraccionada de proteínas usando una secuencia agua-etanol-hidróxido de sodio, en la que el residuo de cada extracción fue tratado con el siguiente solvente de la secuencia. Seguidamente, tanto los extractos como los residuos se sometieron a procesos de deshidratación y cocción, para ser incorporados a las raciones utilizadas en el ensayo biológico de digestibilidad.

Este ensayo fue diseñado tomando como base una proteína de buena calidad (caseína), para observar el efecto del frijol entero, así como de cada una de las fracciones separadas por el procedimiento antes descrito, sobre la digestibilidad de la misma.

Se prepararon nueve raciones, las cuales contenían caseína a un nivel de 10% de proteína. La primera ración sirvió como control; a la segunda se le agregó 20% de harina de frijol completo; las raciones 3, 4 y 5 contenían el residuo de extracción con agua, el extracto acuoso y ambos, respectivamente. Las raciones 6, 7 y 8 contenían el residuo de extracción con etanol, el extracto etanólico y ambos, respectivamente. Finalmente, la ración 9 contenía el residuo de extracción con hidróxido de sodio.

Las raciones preparadas, así como el material inicial —frijol crudo molido— se sometieron a análisis químico proximal, y se determinó el patrón de aminoácidos de cada una de ellas. Tanto los valores de humedad, fibra cruda, nitrógeno y cenizas, como el patrón de aminoácidos, fueron consistentes con los informados en la literatura.

La digestibilidad de la caseína disminuyó significativamente ($P < 0.05$) en la ración con 20% de frijol completo, así como en las raciones que contenían los extractos de agua y etanol. Este efecto se atribuye a la presencia de factores antifisiológicos resistentes al calor, formados durante el procesamiento térmico del frijol completo.

La digestibilidad de la materia seca también fue significativamente menor que la de la caseína en la ración elaborada con frijol completo, y en las raciones que contenían extractos y residuos.

En los grupos que consumieron las raciones 3 y 6, que contenían los residuos de extracción con agua y con etanol, se encontró que la eficiencia de utilización de la proteína fue menor que la de la caseína. Este hecho se atribuyó a una deficiencia de metionina y de lisina en estas fracciones, acentuada más aún por la baja ingesta proteínica de estos animales.

El valor nutritivo inferior se encontró en el grupo 7, cuya ración contenía el extracto etanólico; sin embargo, al agregar este extracto simultáneamente con el residuo etanólico (ración 8), la eficiencia de utilización de la proteína fue superior, debido a que la ración 8 contenía mayor cantidad de metionina y lisina que la 7.

Finalmente, se sugiere la posibilidad de obtener mejores resultados si en las pruebas biológicas se usa un porcentaje mayor de frijol completo y de sus fracciones proteínicas.

INTRODUCCION

Posiblemente uno de los factores que más afecta la utilización de las proteínas del frijol (*Phaseolus vulgaris*) es su digestibilidad, y hasta la fecha no se sabe con certeza si este efecto es causado por una descarga muy rápida del intestino o por resistencia de estas proteínas a la hidrólisis de las enzimas gastrointestinales. Se ha sugerido (1) que la baja solubilidad de algunas fracciones proteínicas reduce su susceptibilidad al ataque enzimático. Numerosos estudios confirman el hecho de que el clásico inhibidor de la tripsina es termolábil, de modo que no podría éste ser responsable de la baja digestibilidad de las proteínas del frijol cocido.

Es indudable que la digestibilidad mejora notoriamente con la cocción (2, 3); sin embargo, la digestibilidad del frijol cocido es todavía baja si se compara con la de otras leguminosas. Jaffé (4), por ejemplo, encontró para el frijol negro una digestibilidad real de 76.80/o, en tanto que en el caso de la soya este valor es de 86.40/o.

Se han aislado del frijol diferentes fracciones proteínicas sumamente resistentes al ataque enzimático. Así, Puzstai (5) informa haber aislado una proteína resistente a la acción de la elastasa pancreática, y Seidl, Jaffé y Jaffé (6) también aislaron una globulina del frijol resistente a la hidrólisis *in vitro* por pepsina, tripsina, quimotripsina, papaína, ficina, huraína y subtilina.

Para determinar la presencia de este tipo de proteínas en las distintas variedades de frijol es necesario uniformar la metodología a utilizar en su extracción, ya que cada investigador aplica diferentes técnicas analíticas, lo que hace sumamente difícil la comparación de resultados.

El propósito de este trabajo fue estudiar el comportamiento biológico de las diferentes fracciones proteínicas aisladas del frijol, siguiendo la secuencia de solventes agua-etanol-hidróxido de sodio propuestas en otro trabajo de investigación (7), a fin de determinar qué fracción o fracciones son responsables de la baja digestibilidad de las proteínas del frijol común.

MATERIALES Y METODOS

El presente estudio consistió en un ensayo biológico en el cual se investigó la posibilidad de que las fracciones proteínicas obtenidas por el sistema de fraccionamiento agua-etanol-hidróxido

de sodio (7) pudiesen interferir con la digestibilidad de una proteína conocida, en este caso caseína.

Preparación del Material para Ensayo Biológico

El fraccionamiento de las proteínas del frijol para ensayo biológico se llevó a cabo usando una secuencia de tres solventes: agua, etanol e hidróxido de sodio (Figura 1); esta secuencia fue seleccionada con base en los resultados de un estudio anterior (7).

La preparación del material se realizó en la Planta Piloto de la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos del INCAP, y la extracción fraccionada de proteína fue efectuada en dos etapas, de acuerdo con la capacidad de trabajo del equipo.

En la primera etapa, se sometieron a extracción 5 kg de frijol molido, variedad S-19N, con 100 lt de agua (relación 1:20 de sólidos-solvente) durante una hora a temperatura ambiente en una marmita de Lee Metal Products con capacidad para 40 galones, provista de una mezcladora "Lightning" tipo T. La suspensión obtenida se pasó a una centrífuga de canasta de Glasgow, Laidlaw y Co. (Glasgow Patents), por medio de una bomba aspirante-impulente, en la que se separó el extracto y el residuo. El residuo se trató de nuevo con 100 litros de agua; se repitieron las operaciones de extracción y centrifugación. Finalmente se obtuvieron 200 litros de extracto acuoso y el residuo de extracción con agua, los cuales fueron almacenados a 5°C.

En la segunda etapa se usaron 7 kg de frijol molido, los que fueron sometidos a extracción con 140 litros de agua dos veces consecutivas. El extracto así obtenido se descartó y el residuo se sometió a extracción con 140 litros de etanol al 70%; el extracto se separó y el residuo se extrajo nuevamente con etanol; se obtuvieron finalmente 280 litros de extracto alcohólico, el cual se almacenó a 5°C. El residuo se dividió en dos porciones; una de ellas se almacenó a 5°C como residuo de extracción con etanol, y la otra se sometió a extracción con 70 litros (relación 1:20 de peso a volumen) de hidróxido de sodio 0.01M, dos veces; el extracto se descartó y el residuo se almacenó a 5°C. Se tomaron muestras, tanto de los extractos como de los residuos, para determinaciones de humedad, con miras a obtener un balance de materia seca.

El extracto acuoso se llevó a sequedad en un horno con aire caliente a 60°C, y el extracto etanólico se concentró en evaporadores Buchler antes de llevarlo a sequedad en el horno con aire caliente.

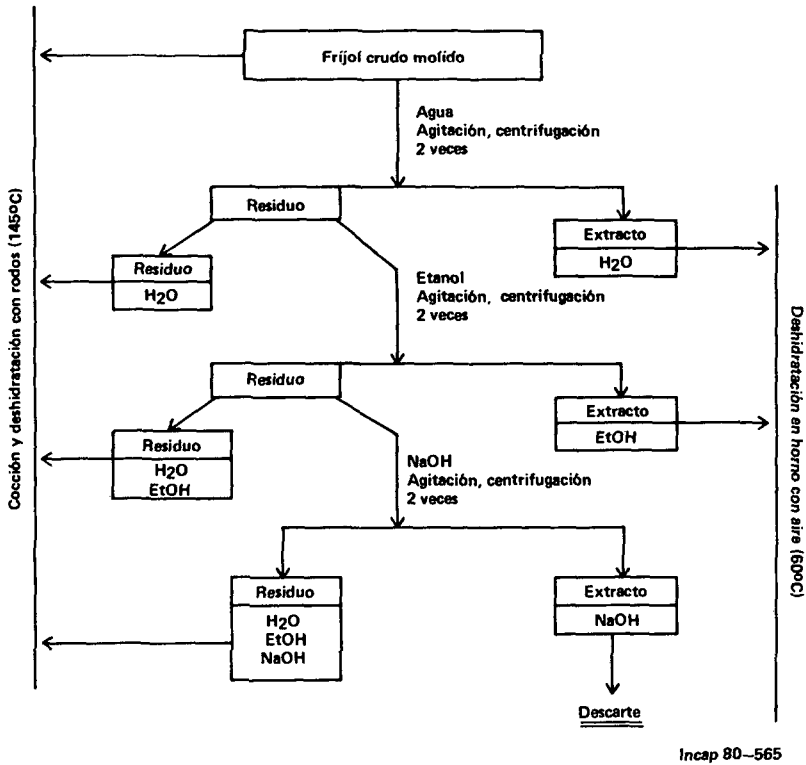


FIGURA 1

Separación de las proteínas del frijol por extracción secuencial con diferentes solventes

En cuanto a los residuos de extracción, éstos se ajustaron a 80% de humedad y la pasta obtenida en esta forma se procesó en un secador de rodillos Reeves Motordrive, de Reliance Electric Co. a una temperatura de 145°C, 60 lb de presión de vapor y una velocidad en los rodos de 5 rpm, condiciones que permitieron la cocción del frijol y la destrucción de los factores antitróficos. El material seco se molió en un molino de platos y se obtuvieron 666 g del residuo de extracción con agua, 1,356 g del residuo de extracción con etanol, y 1,000 g del residuo de extracción con hidróxido de sodio. Además, se procesó en la misma forma 1 kg de

frijol y se obtuvieron 937 g de harina de frijol cocido. Estos materiales se utilizaron en la preparación de las raciones empleadas en el ensayo biológico.

Ensayo Biológico

Se realizó un ensayo biológico de digestibilidad en el que se investigó el efecto de las fracciones proteínicas del frijol sobre la digestibilidad de la caseína. Se empleó un diseño de bloques al azar con nueve tratamientos y ocho réplicas por tratamiento, los cuales se detallan en la Tabla 1.

TABLA 1

TRATAMIENTOS SELECCIONADOS PARA EL ENSAYO BIOLÓGICO

Ración	Tratamiento
1	Control: caseína como fuente de proteína
2	Caseína + 20% harina de frijol
3	Caseína + residuo de extracción con H ₂ O 11.5%
4	Caseína + extracto (seco) H ₂ O 8.5%
5	Caseína + residuo H ₂ O 11.5% + extracto H ₂ O 8.5%
6	Caseína + residuo de extracción con etanol 10.9%
7	Caseína + extracto (seco) etanol 0.57%
8	Caseína + residuo etanol 10.9% + extracto etanol 0.57%
9	Caseína + residuo de extracción con NaOH 8.1%

Animales Experimentales

Para el ensayo biológico se emplearon ratas, cepa Wistar, de la colonia animal del INCAP. Se utilizaron ratas de 21 días de edad con un peso promedio de 45 g; se tomaron ocho ratas por tratamiento, cuatro machos y cuatro hembras, alojándose en jaulas individuales de tela metálica con fondo levadizo. El alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum*.

Digestibilidad

El ensayo de digestibilidad duró 21 días. Los animales tuvie-

ron un período de adaptación de 10 días a la dieta de caseína, y al final de este período se administraron las raciones en estudio. Uno de los grupos permaneció en la dieta de caseína, el cual sirvió como grupo control. El período de adaptación a la nueva dieta duró tres días; le siguieron dos períodos de recolección de heces de cuatro días cada uno, en los cuales se pesaron los animales y el alimento, al inicio y al final del período. Las heces recolectadas se secaron en un horno con aire caliente a 60°C, se pesaron y se molieron en un molino micro Wiley con tamiz malla 40. Se determinó nitrógeno en este material, y la digestibilidad aparente se calculó según la fórmula:

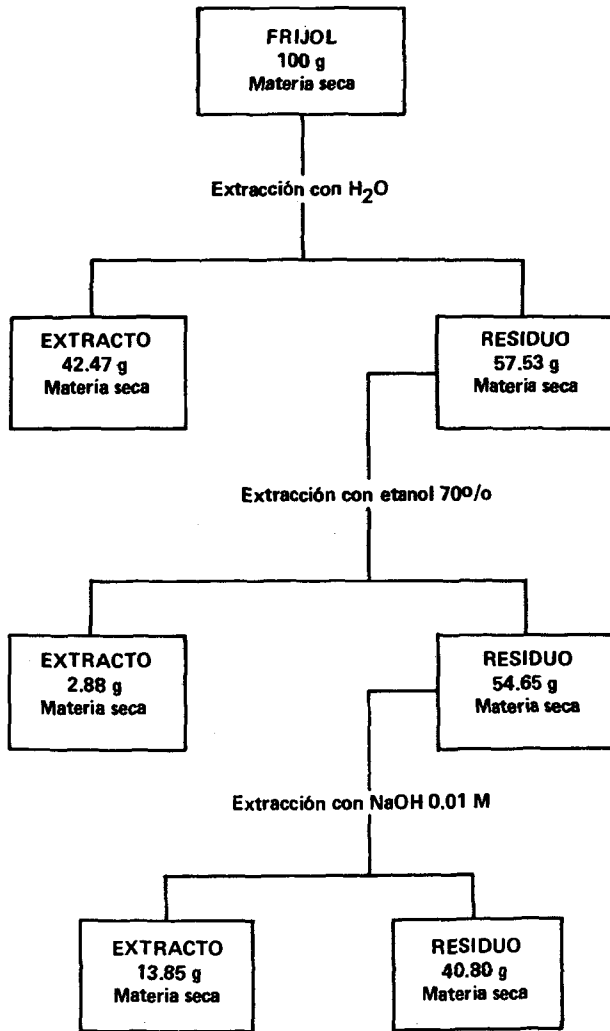
$$D = \frac{\text{Nitrógeno ingerido} - \text{Nitrógeno fecal}}{\text{Nitrógeno ingerido}} \times 100$$

Preparación de las Raciones

Se prepararon nueve raciones cuya composición se especifica en la Tabla 2, utilizando caseína como fuente de proteína en todas las raciones. Luego se calculó la cantidad de caseína necesaria para suministrar 100/o de proteína, y se agregó 40/o de minerales (8), 50/o de aceite de soya, 10/o de aceite de hígado de bacalao y almidón para completar la ración; además, las raciones fueron suplementadas con 5 ml de solución de vitaminas (9) por cada 100 g de ración.

Tomando como base el 200/o de harina de frijol agregada a la ración 2 (Tabla 2), se hizo un cálculo de balance de materiales sobre esta cantidad de frijol sometida a extracciones sucesivas con los solventes mencionados, con el objeto de obtener las proporciones de material seco (extractos y residuos) correspondientes a cada ración. La adición de estos materiales se hizo a expensas de la cantidad de almidón presente en la ración. Estos cálculos se efectuaron con base en la distribución de materia seca que se indica en la Figura 2.

Las raciones en cuya composición se incorporó el extracto acuoso (4 y 5) o el extracto etanólico (7 y 8) se prepararon mezclando dichos extractos secos con almidón y agregando suficiente agua hasta formar una pasta, la que se procesó en el secador de rodos en las condiciones ya descritas para secar los residuos; luego, el material obtenido se mezcló con el resto de los ingredientes de la ración. En el caso de las raciones que contenían residuos de



Incap 80-564

FIGURA 2

Balance de la materia seca

extracción, este material —que había sido previamente procesado— se agregó directamente a la mezcla de los componentes de la ración.

Análisis Químicos

La muestra original, así como las raciones preparadas para el ensayo biológico, se sometieron a análisis para determinar su contenido de humedad, extracto etéreo, fibra cruda, nitrógeno y ceniza según los métodos de la AOAC (10). Se estableció, además, el patrón de aminoácidos en los hidrolizados ácidos (HCl 6N) de las raciones y del frijol crudo según las técnicas descritas para el autoanalizador Technicon.

RESULTADOS

Ensayo Biológico

Raciones. La composición química proximal de las raciones utilizadas en el ensayo biológico figura en la Tabla 3, así como también la del material original. Se observa que el contenido de

TABLA 3

COMPOSICION QUIMICA PROXIMAL DEL FRIJOL CRUDO Y DE LAS RACIONES UTILIZADAS EN EL ENSAYO DE DIGESTIBILIDAD
(Expresada en g/100 g)

Material	Humedad	Extracto etéreo	Proteína (N x 6.25)	Fibra cruda	Ceniza
Harina de frijol crudo	15.01	1.90	20.31	4.80	4.33
Ración 1	14.35	5.59	10.00	0.64	2.68
Ración 2	13.76	5.55	14.06	1.62	3.88
Ración 3	13.88	5.59	11.06	1.36	3.06
Ración 4	9.53	6.37	13.00	0.68	4.02
Ración 5	9.37	7.06	14.06	0.80	4.95
Ración 6	13.96	5.15	10.92	1.28	2.80
Ración 7	9.42	6.45	10.14	0.65	3.78
Ración 8	10.18	7.88	11.06	0.83	3.84
Ración 9	13.90	5.48	10.02	1.08	2.84

humedad fue menor en las raciones 4, 5, 7 y 8, en cuya composición se utilizaron los extractos secos de agua y de etanol comparados con los de las raciones elaboradas con residuos de extracción o frijol como componente. La misma situación se observa en lo que se refiere al contenido de fibra, que para las raciones arriba mencionadas fue de 0.68, 0.80, 0.65 y 0.83^o/o, respectivamente, en tanto que para las raciones 3, 6 y 9, que contenían residuos de extracción, se encontró un contenido de fibra de 1.36, 1.28 y 1.08^o/o, en ese orden. El mayor contenido de fibra correspondió a la ración 2, en la que se incluyó 20^o/o de harina de frijol; en la ración control de caseína el contenido de fibra fue de 0.64^o/o.

En cuanto al contenido proteínico, los datos indican niveles de 14, 13 y 14^o/o, respectivamente, para las raciones 2, 4 y 5, en tanto que para las raciones 3, 6, 7, 8 y 9 estos niveles sobrepasan ligeramente el 10^o/o. Finalmente, el contenido de proteína de la ración 2 con 20^o/o de frijol, resultó ser de 14.06^o/o.

El patrón de aminoácidos de estas raciones se expone en la Tabla 4 expresado en gramos por 100 g de muestra y en la Tabla 5 como g de aminoácido por 16 g de nitrógeno. Al comparar las raciones experimentales con la ración control de caseína (Tabla 5) se aprecia que treonina, metionina y lisina son los aminoácidos esenciales que se encuentran más disminuidos en las raciones experimentales, no importando la fracción de frijol (residuo o extracto) agregada a la caseína. La concentración de los otros aminoácidos esenciales no difiere significativamente entre el control y las raciones experimentales.

Digestibilidad

En la Tabla 6 se presentan los resultados del ensayo de digestibilidad, observándose que con excepción de los grupos 7 y 8 —en cuyas raciones se incluyó el extracto etanólico— los animales consumieron una cantidad de alimento que osciló entre 40 y 64 g durante el período del estudio. En cuanto a las raciones 7 y 8, el consumo promedio fue de 27.5 g.

La digestibilidad aparente de las raciones fue calculada a partir de los valores de nitrógeno ingerido y nitrógeno fecal. La ración que tuvo la menor digestibilidad (79.11^o/o) fue la 2, que incluía 20^o/o de frijol; la digestibilidad más alta encontrada (86.05^o/o) correspondió a la ración 1 que era el control de caseína, seguida de la ración 8, que incluía entre sus componentes el extracto y el residuo etanólicos; el valor de digestibilidad de esta

TABLA 4
PATRON DE AMINOACIDOS DE LAS RACIONES
(gAA/100 g de ración)

Aminoácidos	Frijol crudo	Raciones								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acido aspártico	2.778	0.717	1.274	0.864	1.110	1.288	0.838	0.774	0.801	0.756
Treonina	0.679	0.302	0.377	0.300	0.361	0.394	0.309	0.279	0.312	0.271
Serina	0.628	0.230	0.331	0.249	0.320	0.317	0.249	0.229	0.253	0.214
Acido glutámico	3.131	2.135	2.700	2.399	2.655	2.944	2.385	2.291	2.432	2.209
Glicina	0.884	0.182	0.385	0.237	0.323	0.341	0.238	0.194	0.217	0.207
Alanina	0.863	0.320	0.517	0.339	0.463	0.490	0.343	0.314	0.335	0.340
Valina	1.132	0.627	0.910	0.752	0.808	0.884	0.700	0.682	0.704	0.641
Metionina	0.138	0.216	0.248	0.188	0.210	0.225	0.211	0.198	0.221	0.202
Isoleucina	0.982	0.522	0.734	0.583	0.678	0.731	0.568	0.549	0.570	0.508
Leucina	1.575	0.928	1.208	1.015	1.212	1.244	1.002	0.957	1.023	0.918
Tirosina	0.410	0.360	0.487	0.391	0.462	0.478	0.433	0.299	0.450	0.363
Fenilalanina	1.059	0.481	0.700	0.549	0.688	0.705	0.544	0.504	0.545	0.492
Lisina	1.315	0.908	1.058	0.352	0.957	1.028	0.813	0.762	0.871	0.795
Histidina	0.563	0.272	0.413	0.312	0.347	0.403	0.298	0.262	0.322	0.290
Arginina	1.138	0.309	0.612	0.372	0.474	0.482	0.315	0.322	0.342	0.312
Proteína	20.31	10.00	14.06	11.06	13.00	14.06	10.92	10.14	11.06	10.02

Raciones:

1 = Caseína; 2 = Caseína + frijol; 3 = Caseína + res. H₂O; 4 = Cas + ext. H₂O; 5 = Cas + res. + ext. H₂O;
6 = Cas + res. EtOH; 7 = Cas + ext. EtOH; 8 = Cas + res. + ext. EtOH, y 9 = Cas + res. NaOH.

TABLA 5
PATRON DE AMINOACIDOS DE LAS RACIONES
(gAA/16 g N)

Aminoácidos	Frijol crudo	Raciones								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acido aspártico	13.68	7.17	8.15	7.81	8.54	9.16	7.66	7.65	7.24	7.56
Treonina	3.34	3.02	2.41	2.72	2.78	2.80	2.83	2.76	2.82	2.71
Serina	3.09	2.30	2.12	2.25	2.46	2.25	2.28	2.27	2.29	2.14
Acido glutámico	15.42	21.34	17.28	21.69	20.42	20.94	21.80	22.63	21.99	22.09
Glicina	4.25	1.82	2.46	2.14	2.48	2.42	2.18	1.91	1.96	2.07
Alanina	4.25	3.20	3.31	3.07	3.56	3.48	3.14	3.10	3.03	3.40
Valina	5.57	6.27	5.82	6.79	6.22	6.29	6.40	6.74	6.37	6.41
Metionina	0.68	2.16	1.55	1.70	1.62	1.60	1.93	1.95	2.00	2.02
Isoleucina	4.84	5.22	4.70	5.27	5.21	5.20	5.19	5.42	5.16	5.08
Leucina	7.76	9.26	7.73	9.18	9.32	8.84	9.16	9.45	9.25	9.18
Tirosina	2.02	3.60	3.12	3.54	3.55	3.40	3.96	2.95	4.06	3.63
Fenilalanina	5.22	4.81	4.48	4.96	5.27	5.01	4.98	4.98	4.93	4.92
Lisina	6.48	9.03	6.77	7.70	7.36	7.31	7.43	7.53	7.88	7.95
Histidina	2.77	2.72	2.64	2.82	2.67	2.86	2.73	2.59	2.91	2.90
Arginina	5.60	3.09	3.91	3.37	3.65	3.43	3.21	3.18	3.09	3.12

Raciones:

1 = Caseína; 2 = Cas + frijol; 3 = Cas + res. H₂O; 4 = Cas + ext. H₂O; 5 = Cas + res. + ext. H₂O;
6 = Cas + res. EtOH; 7 = Cas + ext. EtOH; 8 = Cas + res. + ext. EtOH, y 9 = Cas + res. NaOH.

TABLA 6
DIGESTIBILIDAD APARENTE DE LAS RACIONES

Grupo	Alimento consumido (g)	Nitrógeno ingerido (g)	Nitrógeno excretado (g)	Nitrógeno absorbido (g) (aparente)	% Digestibilidad (aparente)
1	48.00 ± 11.7	0.764 ± 0.18	0.101 ± 0.01	0.667 ± 0.19	86.05 ± 4.06
2	58.25 ± 9.5	1.339 ± 0.22	0.284 ± 0.07	1.056 ± 0.16	79.11 ± 2.92
3	58.50 ± 4.5	0.948 ± 0.25	0.182 ± 0.04	0.853 ± 0.06	82.53 ± 2.78
4	49.00 ± 7.1	1.019 ± 0.15	0.184 ± 0.04	0.835 ± 0.14	81.87 ± 3.77
5	40.75 ± 8.1	0.819 ± 0.31	0.169 ± 0.02	0.747 ± 0.19	80.71 ± 4.79
6	60.62 ± 1.9	1.059 ± 0.03	0.162 ± 0.04	0.898 ± 0.06	84.72 ± 3.61
7	27.38 ± 4.8	0.444 ± 0.08	0.084 ± 0.02	0.360 ± 0.07	80.98 ± 2.83
8	28.75 ± 10.4	0.509 ± 0.18	0.070 ± 0.02	0.439 ± 0.19	84.83 ± 5.45
9	64.37 ± 6.3	0.957 ± 0.26	0.160 ± 0.04	0.872 ± 0.10	84.44 ± 3.53

ración fue de 84.830/o, seguido de la ración 6 (residuo etanólico) con un valor promedio de 84.720/o, y luego de la ración 9 (residuo de NaOH). Las raciones 3, 4, 5 y 7 acusaron valores de digestibilidad muy semejantes. El análisis estadístico de los datos presentados reveló diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

Los resultados obtenidos al calcular la digestibilidad de la materia seca se dan a conocer en la Tabla 7. Se puede apreciar que, como en el caso de la digestibilidad de las proteínas, la ración 2 tuvo el menor coeficiente de digestibilidad (90.100/o), en tanto que no se constataron diferencias estadísticamente significativas entre el resto de los tratamientos.

TABLA 7

DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA

Grupo	Materia seca ingerida	Materia seca en heces	o/o de digestibilidad
1	40.77 ± 9.2	1.94 ± 0.2	95.04 ^a ± 1.03
2	51.31 ± 7.8	5.20 ± 1.1	90.10 ^c ± 1.08
3	50.33 ± 3.6	8.71 ± 0.6	92.66 ^b ± 0.80
4	44.08 ± 6.1	3.11 ± 0.8	93.17 ^b ± 2.09
5	36.93 ± 6.9	2.91 ± 0.4	91.97 ^b ± 2.12
6	52.16 ± 1.7	3.39 ± 0.6	93.49 ^b ± 1.20
7	24.80 ± 4.1	1.71 ± 0.3	92.90 ^b ± 1.53
8	25.82 ± 8.8	1.57 ± 0.3	93.51 ^{ba} ± 2.19
9	55.43 ± 5.2	3.51 ± 0.7	91.65 ^{ba} ± 1.17

Los valores identificados con las mismas letras no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

El valor nutritivo relativo y el coeficiente de utilización de las proteínas fueron calculados en función a los de la caseína, con los resultados que se presentan en la Tabla 8. Se encontró que la ración 8, que contenía el extracto etanólico y el residuo de extracción con etanol, acusó el valor nutritivo relativo más alto y el mayor índice de utilización de proteína, siendo estos valores de 80.22 y 11.34. No se observó ninguna diferencia significativa entre los

TABLA 8

VALOR NUTRITIVO RELATIVO* Y EFICIENCIA DE UTILIZACION DE LA PROTEINA DE RACIONES**

Ración	Proteína ingerida (g)	Ganancia en peso (g)	Razón de eficiencia proteínica	Valor nutritivo relativo	Eficiencia de utilización de la proteína
2	25.57 ± 1.4	59.25 ± 14.3	2.29 ± 0.5 ^{bc}	61.24 ± 12.6 ^b	9.17 ± 1.9 ^c
3	17.57 ± 1.4	34.62 ± 7.7	1.97 ± 0.4 ^{ab}	52.67 ± 10.9 ^{ab}	5.55 ± 1.2 ^{ab}
4	21.87 ± 1.9	37.25 ± 15.2	1.69 ± 0.7 ^{ab}	45.45 ± 18.5 ^a	7.30 ± 2.9 ^{ab}
5	23.19 ± 2.6	46.37 ± 8.5	1.99 ± 0.3 ^{ab}	53.41 ± 8.8 ^{ab}	9.62 ± 1.6 ^{cd}
6	17.09 ± 1.5	33.12 ± 9.5	1.91 ± 0.5 ^{ab}	51.19 ± 12.0 ^{ab}	5.34 ± 1.3 ^a
7	16.84 ± 1.4	26.62 ± 8.0	1.57 ± 0.5 ^a	42.08 ± 12.5 ^a	5.43 ± 1.6 ^{ab}
8	18.37 ± 2.2	55.12 ± 9.4	3.00 ± 0.4 ^d	80.22 ± 11.3 ^c	11.34 ± 1.6 ^d
9	18.29 ± 0.9	50.37 ± 8.7	2.75 ± 0.5 ^{cd}	73.49 ± 12.1 ^{bc}	7.65 ± 1.3 ^{bc}

* Valor nutritivo relativo = $\frac{\text{Razón de eficiencia proteínica muestra} \times 75 \text{ (V. B. caseína)}}{\text{Razón de eficiencia proteínica caseína}}$

** Eficiencia de utilización de la proteína = $\frac{\text{Valor nutritivo relativo} \times \text{o/o de proteína muestra}}{100}$

Los valores identificados con las mismas letras no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Los valores identificados con letras diferentes sí acusaron diferencias estadísticamente significativas.

valores determinados para las raciones 3, 4, 5, 6 y 7 en el caso del valor nutritivo relativo de las raciones, y en cuanto al índice de utilización de la proteína, el análisis estadístico sí mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los valores encontrados para las raciones 5 y 8 y el resto de éstas. Las cifras identificadas con las mismas letras no acusaron diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSION

El patrón de extracción del material nitrogenado del frijol es semejante cuando se usa agua antes de cloruro de sodio o cuando se invierte este orden; ello puede ser evidencia de que hay poca, o no hay ninguna, separación entre albúminas y globulinas por solubilidad diferencial. Este hecho ha sido corroborado por varios autores (7, 11).

De acuerdo con este criterio, para la preparación del material a emplearse en el ensayo biológico, se descartó la utilización de cloruro de sodio y se seleccionó una secuencia de agua-etanol-hidróxido de sodio, asumiendo que en las fracciones separadas se obtendría: a) albúminas y globulinas, b) material nitrogenado soluble en etanol, y c) glutelinas.

Ensayo Biológico

El bajo contenido de proteína de algunos extractos y residuos no permitió que éstos fuesen utilizados como fuente única de proteína en la preparación de dietas destinadas a pruebas biológicas de digestibilidad. Por lo tanto, se formuló la hipótesis de que si el frijol completo agregado a una dieta a base de caseína era capaz de disminuir su digestibilidad, también los extractos o residuos obtenidos de este frijol podrían tener el mismo efecto, permitiendo de esta manera aislar los factores responsables de la baja digestibilidad del frijol cocido, ya que los extractos y residuos se obtuvieron en forma secuencial.

Tal como se esperaba, la digestibilidad de la caseína disminuyó significativamente en la dieta que contenía 20% de frijol completo, así como en las raciones que contenían los extractos acuoso y etanólico.

Esta disminución de la digestibilidad de la caseína por efecto del frijol completo podría deberse a factores antifisiológicos

resistentes al calor (polifenoles, por ejemplo) ya que pruebas *in vitro* demostraron la ausencia de inhibidores de la tripsina, tanto en el frijol completo como en sus extractos y residuos. No se descarta la posibilidad de que estos factores antifisiológicos del frijol podrían unirse a la caseína y hacerla resistente a la hidrólisis de las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal.

Se obtuvo evidencia indirecta a favor de esta hipótesis al calcular el porcentaje de digestibilidad de la materia seca, el cual resultó ser significativamente ($P < 0.05$) menor que el de la caseína con el frijol completo.

Los extractos y residuos, aunque en menor grado, también redujeron el porcentaje de digestibilidad de la materia seca, hecho que podría explicarse porque se usaron cantidades grandes de frijol para el fraccionamiento de las proteínas. Por esta razón, puede ser que el proceso no haya sido completo, y se hayan dejado pequeñas cantidades residuales de los precursores de los factores antifisiológicos antes mencionados.

Uno de los efectos más notorios de las fracciones aisladas del frijol fue el observado sobre el valor nutritivo de las raciones preparadas con ellas; este valor se vio afectado por la ingesta de alimento y el patrón de aminoácidos de las fracciones. Por ejemplo, en los grupos que consumieron las raciones 3 y 6 (que contenían los residuos de extracción con agua y con etanol), se encontró que la eficiencia de utilización de la proteína era menor que la de la caseína. Esto podría deberse al patrón de aminoácidos de estas fracciones, el cual es muy deficiente en metionina, treonina y lisina, lo que se reflejó indudablemente en la menor utilización proteínica y ganancia de peso.

Es interesante notar que en el grupo 7, cuya ración contenía el extracto etanólico, el valor nutritivo fue el más bajo, observándose un descenso de peso en los animales experimentales, lo cual implica una utilización deficiente de la proteína. En cambio, en el grupo 8 (que consumió una ración en la que, además del extracto, se incluía el residuo etanólico), el peso se mantuvo aun cuando la ingesta de alimento fue semejante a la del grupo 7. Al comparar el patrón de aminoácidos de estas fracciones, se encontró que el correspondiente al grupo 8 contenía mayor concentración de histidina, lisina y tirosina, lo cual podría explicar la mayor eficiencia de utilización proteínica constatada.

Es posible que el hecho de haber usado pequeñas proporciones de frijol en las dietas a base de caseína, y que estas raciones no fuesen isoproteínicas, haya sido la razón de no haber encontrado

resultados más concluyentes acerca del efecto de las fracciones proteínicas del frijol sobre la digestibilidad. Es probable, asimismo, que usando una mayor proporción de frijol pueda aislarse el factor que interfiere con la digestibilidad de otras proteínas.

SUMMARY

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PROTEIN FRACTIONS ISOLATED FROM COMMON BEANS (*Phaseolus vulgaris*)

The purpose of this study was to determine the factors responsible for the low digestibility of bean proteins. To this effect, protein fractions were isolated from black beans through sequential extraction with distilled water, 70% ethanol and 0.01 M sodium hydroxide. Since the amount of protein extracted with the solvents was very low, it was practically impossible to carry out its biological evaluation in rats. Therefore, the protein fractions were added to casein diets in order to determine the decrease in casein digestibility due to the particular protein fraction added. The extracts and residues were heated and dehydrated prior to their incorporation in the rations.

Nine rations were prepared. The first one was the control with casein only; 20% of whole bean flour was added to the 2nd; rations 3, 4 and 5 contained the water extraction residue, the water extract, and both, respectively; rations 6, 7 and 8 contained the ethanolic residue, the ethanol extract, and both, respectively. Finally, ration 9 was prepared with the NaOH residue. All the materials used as well as the rations were analyzed for their proximate composition and amino acid pattern. The results of the biological evaluation were as follows: casein and dry matter digestibility decreased significantly with the 2nd ration which contained 20% whole bean flour, effect which was significant also in rations containing either the water or the ethanol extract. This effect is attributed to the antiphysiological factors present in the beans which are resistant to heat treatment. The protein efficiency ratio was lower for the rations prepared with the residues from water and ethanol extractions (3 and 6) than for casein; these results are attributed to the lysine and methionine deficiency in the protein fractions, complicated by a lower protein intake. The lowest nutritive value was found in group 7, which was fed the ration containing the ethanol extract, but when the latter was added together with its residue (ration 8), the PER was superior than for ration 7, possibly due to a higher content of methionine and lysine in ration 8. Finally, it is suggested that better results could be obtained by using higher amounts of beans and their protein fractions in the ration.

BIBLIOGRAFIA

1. Bressani, R. & L. G. Elías. Vegetable protein foods for developing areas. **Adv. Food Res.**, **16**: 1-103, 1968.
2. Finks, A. J. & C. Johns. The nutritive value of the proteins from velvet beans. **Am. J. Physiol.**, **57**: 61-67, 1921.
3. Jaffé, W. G. Protein digestibility and trypsin inhibitor activity of legume seeds. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **75**: 219-220, 1950.
4. Jaffé, W. G. El valor biológico comparativo de algunas leguminosas de importancia en la alimentación venezolana. **Arch. Venezol. Nutr.**, **1**: 107-126, 1950.
5. Pusztai, A. General properties of a protease inhibitor from the seed of kidney beans. **European J. Biochem.**, **5**: 252-259, 1968.
6. Seidl, D., M. Jaffé & W. G. Jaffé. Digestibility and proteinase inhibitory action of a kidney bean globulin. **J. Agric. Food Chem.**, **17**: 1318-1321, 1969.
7. Gómez-Brenes, R. A., E. I. Núñez, R. Bressani & J. E. Braham. Efecto de varios solventes sobre la extracción de las fracciones proteínicas del frijol (*Phaseolus vulgaris*). **Arch. Latinoamer. Nutr.**, **33**(3): 503-518, 1983.
8. Hegsted, D. M., M. C. Mills, C. A. Elvehjem & E. B. Hart. Choline in the nutrition of chicks. **J. Biol. Chem.**, **138**: 459-466, 1941.
9. Manna, L. & S. M. Hauge. A possible relationship of vitamin B₁₃ to orotic acid. **J. Biol. Chem.**, **202**: 91-95, 1953.
10. Association of Official Agricultural Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 9th ed. Washington, D. C., The Association, 1960, 832 p.
11. Pant, R. & D. R. P. Tulsiani. Solubility, amino acid composition, and biological evaluation of proteins isolated from leguminous seeds. **J. Agric. Food Chem.**, **17**: 361-366, 1969.