PROTEINAS DE LUPINO DULCE (*Lupinus luteus*, var. Aurea/ Weico, y *Lupinus albus*, var. Multolupa). I. EXTRACCION Y FILTRACION POR SEPHADEX[1]

Magaly Vásquez[2], *Enrique Knapp*[3], *Ernesto Guzmán*[4] *e Isabel Zacarías*[5]

Universidad de Chile
Santiago, Chile

RESUMEN

Las investigaciones de índole nutricional realizadas en la harina de lupino en Chile, han motivado el tener un conocimiento más a fondo de las proteínas de esta leguminosa. Las especies sometidas a estudio fueron *Lupinus luteus* var. Aurea/Weico y *Lupinus albus* var. Multolupa. A estas especies se les extrajeron y fraccionaron las proteínas, determinándose la distribución porcentual de globulinas y albúminas. Las semillas descascaradas, previo análisis proximal, se molieron, desgrasaron y extrajeron sucesivamente con agua destilada a un pH de 5.0, con solución amortiguadora de fosfato 0.05 M, pH 8.5. Las proteínas extraídas se determinaron según el método de Lowry simplificado. Las globulinas (pH 8.5) de ambos lupinos se filtraron por Sephadex G-100 y las del *L. albus* se filtraron además por Sephadex G-150; a las fracciones colectadas se les midió la absorbancia a 280 nm. Las semillas descascaradas (SD) de *L. luteus* y de *L. albus* evidenciaron un contenido de proteínas de 58.2 y 41.0%, respectivamente.

Manuscrito modificado recibido: 6–5–88.

1 Esta investigación fue financiada por el Departamento de Investigación y Bibliotecas (DIB) de la Universidad de Chile, mediante la subvención B-1035.

2 Profesor Titular, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Departamento de Agroindustria y Tecnología de Alimentos, Universidad de Chile, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA).

3 Tesista, Carrera de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile.

4 Profesor Asistente, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.

5 Toda correspondencia y solicitud de reimpresos debe dirigirse a la Dra. Isabel Zacarías, Ayudante 1º, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile, Casilla 15138, Santiago 11, Chile.

Como resultado del análisis de las proteínas extraídas de harina desgrasada, el *L. luteus* mostró un 17.0o/o de albúminas y 58.4o/o de globulinas; en cambio, el *L. albus* presentó un porcentaje más alto de albúmina (55.6o/o) y globulinas (31.5o/o). A su vez la filtración de los globulinas por el Sephadex mostró en ambas especies de lupino un pico I preponderante, el cual en el *L. luteus* correspondió a 55.0o/o y en el *L. albus* a 84.1o/o del contenido total de globulinas.

De lo anterior, es posible concluir que la semilla descascarada de *L. luteus* acusa un 42.0o/o más de proteína que la semilla de *L. albus*. La metodología aplicada señala un predominio de las globulinas sobre las albúminas en el *L. luteus*; no así en el *L. albus*, donde el porcentaje de albúminas es mayor.

INTRODUCCION

El consumo de leguminosas de grano asegura un aporte de calorías y proteínas que adquiere más relevancia en los países en desarrollo, ya que ayuda a cubrir los requerimientos nutricionales humanos (1).

En Chile, aparte de las leguminosas tradicionales (poroto, lenteja, arveja y garbanzo) se ha introducido el cultivo del lupino dulce que por su resistencia al frío, se puede cultivar en la zona sur del país (desde Ñuble hasta Osorno) donde por razones de clima y suelo, no prosperan otras leguminosas (2).

En los últimos años se han realizado numerosas investigaciones tendientes a conocer las posibilidades de utilización del lupino dulce, tanto en la alimentación humana como animal. Diversos autores han informado acerca de las características del cultivo, composición química, toxicidad y valor biológico de esta leguminosa (3-8). Sin embargo, se nota una deficiencia en lo que respecta a la caracterización de las proteínas en lo que a la relación con el fraccionamiento y separación de esta molécula concierne. De ahí que los objetivos del presente trabajo fueron:

1. Lograr un mayor conocimiento de las proteínas constituyentes de dos especies de lupino dulce cultivados en Chile.
2. Establecer mediante el fraccionamiento de las proteínas, la distribución porcentual de globulinas y albúminas.

MATERIAL Y METODOS

Las semillas de lupino dulce analizadas en el presente estudio correspondían a dos especies (*L. luteus* var. Aurea/Weico y *L. albus* var. Multolupa), procedentes del Campo Experimental Semillas Baer de Gorbea, IX Región.

Se efectuó un análisis proximal (humedad, cenizas, proteínas, extracto etéreo y fibra cruda) según los métodos establecidos por la AOAC (9), a las semillas de lupino enteras y descascaradas en forma manual.

En la Figura 1 se esquematiza el método seguido para extraer y fraccionar las proteínas de ambas especies de lupino. Se inició la extracción con las semillas descascaradas, molidas y desgrasadas en Soxhlet con n-pentano (p. eb. 36.1oC). La molienda se llevó a cabo en un molino Thomas-Wiley provisto de criba No. 80.

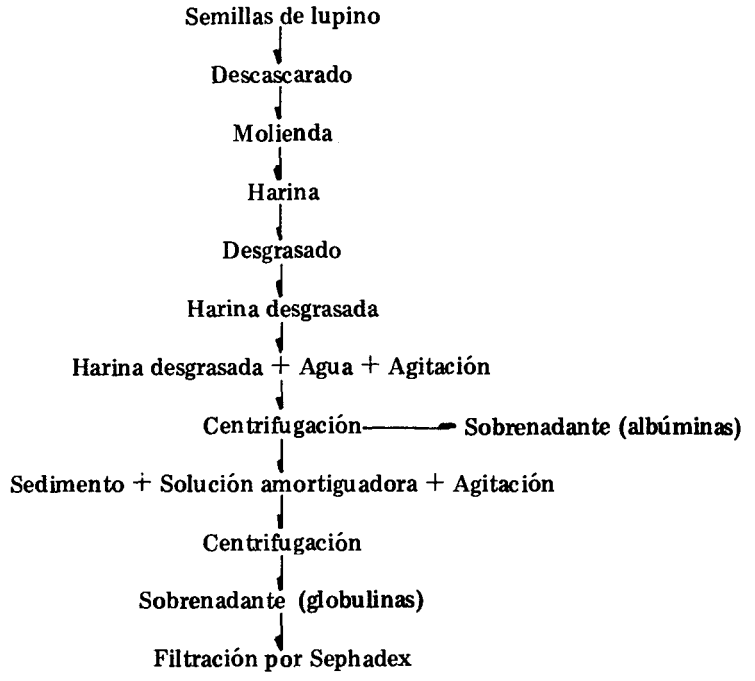

FIGURA 1

Diagrama de extracción y filtración de proteínas de lupino

Extracción de Proteínas

Las albúminas se separaron por centrifugación. Para ello, la harina desgrasada se adicionó con agua destilada pH 5.0 en la proporción 1:20 (p/v), y se agitó una hora en agitador Vortex (10). Luego la suspensión se centrifugó por 30 min a 10,000 rpm. en una centrífuga MSE High Speed 18. A continuación se retiró el sobrenadante cuidadosamente y las proteínas contenidas en él se determinaron por el método de Lowry simplificado (11).

Para la separación de las globulinas el sedimento de la centrífugación anterior se suspendió en solución amortiguadora de fosfato 0.05 M, pH 8.5 en la proporción 1:20 (p/v) y se agitó durante una hora, centrifugándose a 10,000 rpm durante 30 minutos (12). Las globulinas extraídas se determinaron según el método de Lowry simplificado (11).

Filtración por Sephadex

Del extracto de globulinas, se tomó una alícuota de 2 ml, la que se filtró a través de columna Sephadex G-100 (2 x 60 cm) equilibrada con solución amortiguadora de fosfato 0.05 M, pH 8.5. Esta misma solución

amortiguadora se empleó para eluir las globulinas, colectándose 50 fracciones de 3 ml cada una, que se leyeron a 280 nm en espectrofotómetro Perkin-Elmer Coleman 124. Las lecturas de absorbancia se graficaron versus el número de fracción. Además, las fracciones correspondientes a cada pico se mezclaron para determinar su contenido de proteína (11). El Sephadex G-100 fracciona proteínas globulares que van desde un peso molecular de 4,000 hasta 150,000 (13).

Dado que el fraccionamiento de las globulinas del *Lupinus albus* var. Multolupa no fue suficientemente concluyente, se realizó una nueva filtración del extracto de globulinas de esta especie. Se utilizó una columna de Sephadex G-150 (2 x 80 cm) equilibrada con una solución amortiguadora de fosfato 0.05 M, pH 8.5. Se colectaron 100 fracciones de 3 ml cada una y se leyó su absorbancia a 280 nm. En este ensayo a cada fracción colectada se le determinó el contenido de proteína (11). El Sephadex G-150 fracciona proteínas globulares cuyo peso molecular cubre desde 5,000 hasta 400,000 (13).

Análisis Estadístico

Cada unidad experimental se eligió al azar y consistió en 250 g de semillas de lupino de ambas especies. Se hicieron cuatro repeticiones, y las posibles diferencias entre las especies para cada variable se midieron a través de la prueba "t" de Student para la diferencia de medias, y pruebas Z de comparación entre proporciones para los resultados expresados en porcentajes (14).

RESULTADOS Y DISCUSION

La Tabla 1 expone la composición química proximal de las dos especies de lupino dulce, en el cual se destaca el alto contenido de proteínas de esta leguminosa, hecho que coincide con lo informado por Rosa (15), Hill (16) y Aguilera y Trier (17).

En cuanto al extracto etéreo, se puede observar que a un mayor porcentaje de éste, menor el porcentaje de proteínas (12.9o/o vs 33.4o/o y 5.6o/o vs 45.8o/o) en el *Lupinus albus* y *Lupinus luteus*, respectivamente.

El fraccionamiento de las proteínas (Tabla 2) reveló una distribución de 17o/o para albúminas y 58.4o/o para globulinas en el *L. luteus*. A diferencia del caso anterior, el *L. albus* acusó un mayor contenido de albúminas (55.6o/o) y un menor contenido de globulinas (31.5o/o). Ambas especies difieren estadísticamente entre sí ($P < 0.001$) en cuanto al contenido de albúminas y globulinas.

En los lupinos estudiados quedó un porcentaje de proteína sin extraer, siendo éste de 24.6o/o en el *L. luteus* y de 12.9o/o en el *L. albus*. Es importante señalar que el método Kjeldahl utilizado en la determinación de proteínas considera el nitrógeno total, por lo que el contenido de proteínas de la harina desgrasada estaría sobrevalorado. En cambio, para determinar el contenido de proteína extraída, se utilizó el método de Lowry *et al.* (11) que determina la proteína como tal. Por esta razón, la proteína retenida podría atribuirse en parte a nitrógeno no proteínico

TABLA 1

COMPOSICION QUIMICA DE DOS ESPECIES DE LUPINO DULCE, EN SEMILLA ENTERA (SE) Y SEMILLA DESCASCARADA (SD)

Especie		Humedad (g/100 g)	Cenizas	Proteínas (N x 6.25)	Extracto etéreo	Fibra cruda	Extracto no no nitrogenado*
		g/100 g peso seco					
Lupinus luteus var. Aurea Weico	SE	13.4	4.0	45.8	5.6	14.7	29.9
	SD	11.2	4.8	58.2	6.3	1.8	28.9
Lupinus albus var. Multolupa	SE	15.9	3.7	33.4	12.9	11.3	38.7
	SD	12.7	3.9	41.0	13.4	1.6	40.1

* Por diferencia.

TABLA 2

FRACCIONAMIENTO DE PROTEINAS DE *Lupinus luteus* var. Aurea/Weico Y *Lupinus albus* var. Multolupa

Especie	Proteína de la har. desgrasada (mg)	Proteína extraída (mg)	Porcentaje extraído (%)
L. luteus var. Aurea/Weico	173.5 ± 0.97*		
Albúminas		29.5 ± 1.14	17.0
Globulinas		101.3 ± 5.57	58.4
Total		130.8	75.4
L. albus var. Multolupa	122.6 ± 0.01		
Albuminas		68.2 ± 10.31	55.6
Globulinas		38.6 ± 7.27	31.5
Total		106.8	87.1

* Media ± DE.

(aminoácidos, dipéptidos y otros compuestos de bajo peso molecular) según lo informado por Wiewiorowski *et al.*, citados por Hill (16).

Los trabajos recientes sobre estudios de proteínas de *L. luteus* no han puesto el énfasis en el contenido de albúminas y globulinas de esta especie. Hill (16) hace notar que la cantidad de globulinas es superior a la de albúminas.

Con respecto al *L. albus*, Cerletti y Restani (18), y Duranti, Restani y Cerletti (19, 20), han encontrado que las globulinas representan alrededor del 80o/o y las albúminas el 13o/o de las proteínas totales. En cambio, Oomah y Bushuk (21), aplicando una metodología similar a la utilizada en este estudio, informan un contenido mayor de albúminas (70o/o) que de globulinas (20o/o), valores que se aproximan a los obtenidos en esta investigación (Tabla 2).

La comparación de resultados de fraccionamiento proteínico presenta dificultades, debido a que en los estudios realizados se han empleado distintos solventes, agentes de precipitación, tiempo y temperatura de extracción en las especies de lupino analizadas.

En la Tabla 3 se aprecia que la filtración de las globulinas de ambas especies de lupino, a través de Sephadex G-100, evidencia el fraccionamiento de estas proteínas en tres picos para el caso del *L. luteus* donde el pico I revela el mayor contenido de globulina, equivalente a 18.6 ± 1.99 mg (55.0o/o). Le sigue en orden de importancia el pico II, con 12.2 ± 0.89 mg (36.1o/o) y por último, el pico III que es menos relevante porque acusa un 2.7o/o del total. Dado que el Sephadex G-100 fracciona proteínas globulares cuyo peso molecular está entre 4,000 hasta 150,000, el hecho que el pico I haya eluido entre los tubos 9 y 17 hace suponer que el 55o/o de las globulinas del *L. luteus* presenta un peso molecular superior a los 150,000.

TABLA 3

DISTRIBUCION DE LAS GLOBULINAS DE *L. luteus* var. Aurea/Weico Y *L. albus* var. Multolupa, A TRAVES DE SEPHADEX G-100

Especie	Globulina inicial (mg)	Globulina fraccionada (mg)	o/o
L. luteus var. Aurea/Weico	33.8± 1.85*		
Pico I		18.6± 1.99	55.0
Pico II		12.2± 0.89	36.1
Pico III		0.9± 0.11	2.7
L. albus var. Multolupa	13.2± 2.05		
Pico I		11.1± 2.60	84.1
Pico III		0.7± 0.07	5.3

* Media ± DE.

En cuanto al *L. albus* se presenta también un pico I preponderante que representa 84.1o/o del total de las globulinas. No hay elución de las proteínas entre los tubos 17 y 29; por lo tanto, no se evidencia el pico II, al inverso del caso anterior. En lo que respecta al pico III, éste contiene 0.7 ± 0.07 mg de globulina.

La ausencia del pico II en el *L. albus,* en las globulinas eluidas del Sephadex G-100 motivó una segunda filtración de las globulinas a través de Sephadex G-150, cuyo resultado se ilustra en la Figura 2. En ella se observa nuevamente que gran parte de las globulinas eluyen en el pico I (tubos 20 al 35), demostrando que escurren rápidamente entre las partículas del Sephadex, por lo que su peso molecular sería vecino o superior a 400,000. A continuación aparece un pico muy bajo en contenido proteínico (tubos 49 al 82) que, por su ubicación y proteínas correspondería al pico III. Las fracciones colectadas entre los tubos 36 al 48 demostraron ausencia de globulina, por lo que no se evidenció el pico II en esta especie de lupino.

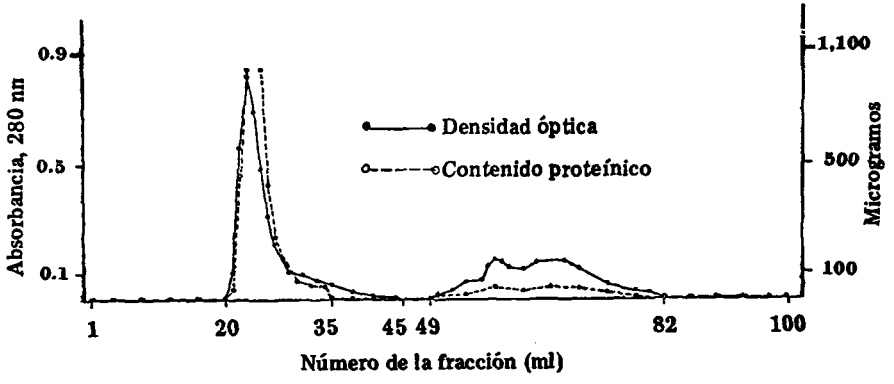

FIGURA 2

Filtración de globulinas de *Lupinus albus*, var. Multolupa, a través de Sephadex G-150, pH 8.5

Otros autores como Joubert (22) y Sgarbieri y Galeazzi (23) trabajando con *L. albus* lograron separar también las globulinas en dos picos, aunque Joubert utilizó un procedimiento distinto sobre la base de precipitación con sulfato de amonio y ultracentrifugación.

En base a los resultados obtenidos en el trabajo objeto de este artículo, se puede concluir que la leguminosa estudiada tiene un porcentaje superior de proteínas, en comparación con las leguminosas tradicionales chilenas.

De ambas especies analizadas, el *L. luteus* presenta un 37o/o más de proteínas en la semilla entera que el *L. albus.*

La metodología empleada señala un predominio de las globulinas sobre las albúminas en el *L. luteus*, no así en el *L. albus*, donde el caso es inverso.

La filtración a través de Sephadex permite una primera separación de las globulinas, y muestra el pico I como el más preponderante en ambas especies de lupino.

SUMMARY

SWEET LUPINE (*Lupinus luteus*, var. Aurea/Weico AND *Lupinus albus*, var. Multolupa) PROTEINS. I. EXTRACTION AND FILTRATION BY SEPHADEX

Samples of *Lupinus luteus*, var. Aurea/Weico and *Lupinus albus* var. Multolupa flours were analyzed. The flour proteins were extracted and fractionated by gel filtration, and the per cent pattern for both globulins and albumins was then determined. The dehulled seeds, previously analyzed for composition, were ground, defatted and consecutively extracted with distilled water (pH 5.0) and phosphate buffer (0.05 M, pH 8.5). The extracted protein content was measured by the Lowry simplified method. Globulins (pH 8.5 fraction) from both species were filtered through Sephadex G-100; besides, *Lupinus albus* globulins were filtered through Sephadex G-150, and absorbance of the collected fractions was measured at 280 nm. The dehulled seed (DS) of *L. luteus* and *L. albus* revealed a good protein content (58.2 and 41.0%, respectively). The protein extracted from *L. luteus* was constituted by 17% albumins and 58.4% globulins. In contrast, *L. albus* presented a higher albumin content (55.6%) than globulins (31.5%). The elution pattern for the Sephadex G-200 gel filtration showed for both lupine species analyzed a preponderant peak I corresponding in *L. luteus* to 55.0% and in *L. albus* to 84.1% of the total globulins content. From these results, it may be concluded that the dehulled seed protein content is 42.0% higher for the *L. luteus* sample than for the *L. albus*. The applied methodology indicated a predominant content of globulins above albumins in *L. luteus*, while in the case of *L. albus*, the albumin content was the highest.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su sincero agradecimiento a la Srta. Pilar Gómez y a la Sra. Eugenia Orrego por su valiosa colaboración en la realización de este estudio, y a la Sra. Viola Lyon por la excelente labor secretarial en la confección de este manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

1. Haytowitz, D., A. C. Marsh & R. H. Matthews. Content of selected nutrients in raw, cooked, and processed legumes. **Food Technol., 35**: 73-74, 1981.
2. Castro, E. Lupino: Cultivo y utilización. **El Campesino, CIX**(8): 24-42, 1978.
3. Cross, R. & E. von Baer. Posibilidades del *Lupinus mutabilis* y *Lupinus albus* en los países andinos. **Arch. Latinoamer. Nutr., 27**: 451-471, 1977.

4. Fundación Chile. **Situación, Análisis y Perspectivas del Lupino en Chile.** Reunión de Trabajo 1-2 Dic. Santiago, 117 pp.
5. Ballester, D., M. T. Saitúa, O. Brunser, J. I. Egaña, D. F. Owen & E. Yáñez. Evaluación toxicológica del lupino dulce. I. Estudio en ratas alimentadas durante 9 meses con *Lupinus albus*, var. Multolupa. **Rev. Chil. Nutr., 10:** 177-191, 1982.
6. Oliva, P. & D. Ballester. Composición química y calidad biológica de leguminosas precocidas de consumo habitual en Chile (lentejas, porotos, garbanzos) y su complementación con harina de lupino dulce. **Rev. Chil. Nutr., 12:** 51-56, 1984.
7. Gardiman, G. & D. Ballester. Fideos enriquecidos con harina desgrasada de lupino dulce. *(L. albus* cv Multolupa). I. Aspectos reológicos y nutricionales. **Rev. Chil. Nutr., 12:** 91-96, 1984.
8. Zacarías, I., E. Yáñez, H. Araya & D. Ballester. Evaluación sensorial y estudio de aceptabilidad, a nivel de consumidor de pan suplementado con harina de lupino dulce. **Arch. Latinoamer. Nutr., 35:** 119-129, 1985.
9. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC.** 13th ed. Washington, D. C., The Association, 1980.
10. Cerletti, P., A. Fumagalli & D. Venturin. Protein composition of seeds of *Lupinus albus*. **J. Food Sci., 43:** 1409-1414, 1978.
11. Peterson, G. L. A simplification of the protein. Assay Method of Lowry *et al.* Which is more generally applicable. **Analytical Biochem., 83:**346-356, 1977.
12. Ruiz, L. P. & E. L. Have. Conditions affecting production of a protein isolate from lupin seed kernels. **J. Sci. Food Agric., 27:** 667-670, 1976.
13. Pharmacia Chemicals. **Sephadex Gel Filtration in Theory and Practice.** Uppsala Sweden, Upplands Grafiska AB, 1975, 65 p.
14. Steel, R. G. & G. H. Torrie. **Principles and Procedures of Statistics with Special Reference to the Biological Sciences.** New York, N. Y., McGraw Hill Book, 1960, 481 p.
15. Rosa, J. *Lupinus luteus*, variedad Aurea como sustituto parcial de la harina de pescado para cerdos en crianza-engorda. **Agric. Tec., 34:** 158-160, 1974.
16. Aguilera, J. M. & A. Trier. The revival of the lupin. **Food Technol., 32**(8): 70-76, 1978.
17. Hill, G. D. The composition and nutritive value of lupin seed. **Nutr. Abstr. Revs.,** B **47**(8): 511-529, 1977.
18. Cerletti, P. & P. Restani. The glycoprotein component of seed globulins in *Lupinus albus*. **Italian J. Biochem., 23:** 319-320, 1979.
19. Duranti, M., P. Restani & P. Cerletti. Associazioni oligomeriche nelle globuline di *Lupinus albus*. En: **26º Congresso Nazionale Societá Italiana Biochimica.** Bologna, 1980, 186 p.
20. Duranti, M., P. Restani, M. Poniatowska & P. Cerletti. The seed globulins of *Lupinus albus*. **Phytochemistry, 20:** 2071-2075, 1981.
21. Oomah, B. D. & W. Bushuk. Characterization of lupine proteins. **J. Food Sci.,** 48: 38-41, 1983.
22. Joubert, F. J. Lupin seed proteins, a physico-chemical study of the proteins from white lupin seed *(Lupinus albus)*. **Biochem. Biophys. Acta, 19:** 172-173, 1956.
23. Sgarbieri, V. C. & M. A. Galeazzi. Some physico-chemical and nutritional properties of a sweet lupin *(Lupinus albus*, var. Multolupa) protein. **J. Agric. Food Chem., 26:** 1438-1442, 1978.