PROTEINAS DE LUPINO DULCE (*Lupinus luteus* var. Aurea/Weico, Y *Lupinus albus* var. Multolupa). II. SEPARACION POR ELECTROFORESIS[1]

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

Universidad de Chile
Santiago, Chile

RESUMEN

En este estudio se analizaron las albúminas y globulinas extraídas del *Lupinus luteus* var. Aurea/Weico y *Lupinus albus* var. Multolupa mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida. El propósito fue el de determinar la distribución porcentual de albúminas y globulinas de las proteínas en los electroforetogramas, con su consiguiente caracterización, según su movilidad.

El densitograma de las albúminas del *L. luteus* evidenció seis fracciones de las cuales las fracciones 2 y 4 contribuyeron con 58.1o/o. En cuanto a las globulinas, el densitograma reveló cinco fracciones de las cuales las fracciones 1, 2 y 3 contribuyeron con 90.7o/o. El densitograma de las globulinas eluídas en el pico I a través de Sephadex G-100, reveló dos fracciones que guardaron semejanza con las fracciones 1 y 2 de las globulinas totales y cuya movilidad relativa dio valores bajos comprendidos entre 0.26 y 0.39. Las albúminas del *L. albus* se resolvieron en cuatro fracciones, siendo la más representativa la fracción 2, con 54.3o/o. Respecto al fraccionamiento de las globulinas, se obtuvieron cinco fracciones que coincidieron en su distribución con las globulinas del pico I, acusando la fracción 2 la mayor contribución (48.2o/o). Se

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 1035.

2 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.

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 Profesor Titular, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile.

evidenció que el Sephadex G-100 no lograba una buena separación. En cuanto a la movilidad electroforética de estas globulinas, se destacaron las fracciones 2 y 3, con movilidades de 0.35 y 0.48.

A partir de este trabajo, se puede concluir que las albúminas del *L. luteus* que presentan un mayor número de fracciones son de menor movilidad relativa que las albúminas del *L. albus*. En cuanto a las globulinas de ambas especies de lupino, éstas se caracterizan por presentar agrupaciones de baja y alta movilidad, respectivamente.

INTRODUCCION

En Chile se ha desarrolladado desde 1956, en el Campo Experimental "Semillas Baer" (Gorbea), un importante programa de lupino que comprende estudios genéticos y agronómicos. De dichas investigaciones han derivado los lupinos dulces tales como la variedad Aurea *(L. luteus)* y la variedad Multolupa *(L. albus)* que se caracterizan por la ausencia de amargor debida al bajo contenido de alcaloides. El cultivo del lupino se lleva a cabo con éxito en la zona austral (36-41° latitud Sur) especialmente en el sector agrícola minifundista (1, 2).

El alto contenido de proteínas (28-40°/o) (3) ha servido de motivo a diversos investigadores para obtener y caracterizar concentrados y aislados proteínicos (4, 5). Juntamente con estos estudios se han realizado otras investigaciones que caracterizan las proteínas del lupino (6-10).

Dado que en Chile se han determinado las propiedades funcionales de los aislados proteínicos, este estudio se orientó hacia el análisis de las proteínas de lupino (11).

Los objetivos del estudio fueron dos:

1. Determinar la distribución porcentual de albúminas y globulinas por electroforesis.
2. Caracterizar las albúminas y globulinas según su movilidad electroforética.

MATERIAL Y METODOS

Electroforesis

Las proteínas de los picos I y II del *L. luteus* var. Aurea/Weico y del pico I del *L. albus* var. Multolupa obtenidos de la elución a través de una columna de Sepahdex G-100, de las albúminas y globulinas extraídas a partir de harina desgrasada, según lo descrito por Vásquez *et al.* (12), se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5.15°/o. Las albúminas y globulinas extraídas fueron sometidas a este mismo procedimiento. Dicha resolución electroforética se realizó en sextuplicado a través de gel de poliacrilamida al 5.15°/o (p/v) en tubos de vidrio de 7 mm de diámetro por 12 cm de largo, con una intensidad de corriente de 20 miliamperes, según la técnica de Davis (13). Posteriormente las proteínas se revelaron con azul brillante Coomassie R-250 (14) y se

leyeron en densitómetro Gelman ACD-15, que permite conocer la distribución porcentual de cada fracción proteínica dentro de la muestra.

Las fracciones proteínicas se caracterizaron, según su movilidad electroforética, mediante la formula de Weber y Osborn (14).

$$\text{Movilidad} = \frac{\text{DMF}}{\text{LGD}} \times \frac{\text{LIG}}{\text{DMC}}, \text{ donde:}$$

DMF = Distancia de migración de la fracción proteínica respectiva.
LGD = Longitud del gel decolorado.
LIG = Longitud inicial del gel.
DMC = Distancia de migración del colorante.

Las albúminas y el pico I eluído por Sephadex G-100 del *L. albus* var. Multolupa se analizaron por electroforesis con dodecil sulfato de sodio en gel de poliacrilamida (6.15o/o), conforme a la técnica de Laemmli (15). Luego, las proteínas se revelaron con azul brillante Coomassie R-250 (14).

Análisis aminoacídico

Este análisis se efectuó de acuerdo al método de Kohler y Palter (16) en un "pool" proveniente de seis extracciones sucesivas de albúminas y globulinas de ambas especies de lupino, según se describió anteriormente (12).

Las soluciones de albúminas y globulinas provenientes de sucesivas extracciones se liofilizaron en un equipo Eyela Freeze Dryer FD-1, y se formó un "pool" de proteínas. Estas se sometieron a hidrólisis con HCl 6*N* por 22 horas a 110oC, y el hidrolizado se concentró en un evaporador rotatorio (Rotavapor-R Buchi), se lavó con agua repetidas veces, y se suspendió en una solución amortiguadora de citrato (pH 2.2). En seguida se inyectó en un analizador de aminoácidos Hitachi Perkin-Elmer KLA-3B, basado en el principio de Spackman, Stein y Moore (17).

RESULTADOS Y DISCUSION

El densitograma de las albúminas (Figura 1) separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida del *L. luteus* var. Aurea/Weico mostró seis fracciones, de las cuales dos estaban presentes en mayor proporción; la fracción 4 que representó el 40.8o/o, y la fracción 2 con 17.3o/o del total. Se confirmó que la extracción con solvente proporciona mezclas heterogéneas de proteínas, y de ahí la necesidad de emplear técnicas más precisas de separación. Respecto a las albúminas del *L. luteus* existe poca información de técnicas de separación por ultracentrifugación, filtración molecular o electroforesis.

En la Figura 2 el densitograma de las globulinas del *L. luteus* muestra cinco fracciones. De éstas, la 1 (24.9o/o), la 2 (34.3o/o) y la 3 (31.5o/o) hacen el mayor aporte. Una de las primeras separaciones electroforéticas de estas globulinas las realizó Joubert (18) con el instrumento de Tiselius

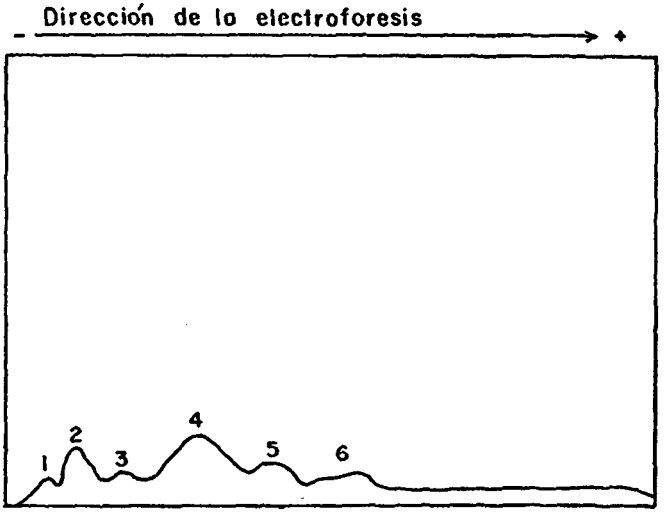

FIGURA 1

Densitograma de albúminas del *L. luteus* var. Aurea/Weico

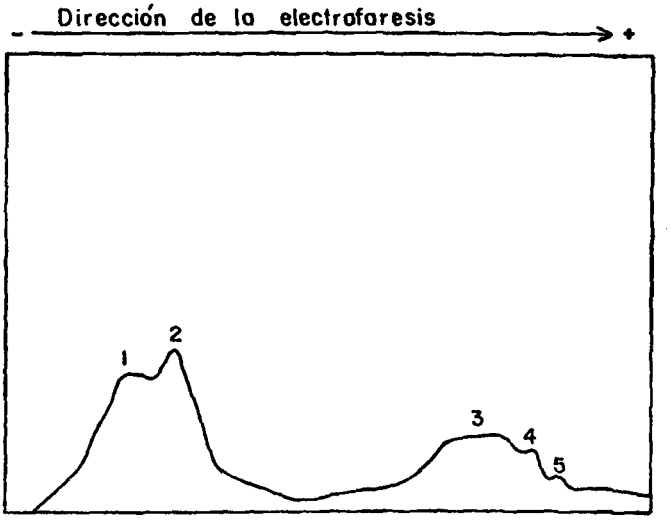

FIGURA 2

Densitograma de globulinas del *L. luteus* var. Aurea/Weico

obteniendo tres fracciones proteínicas de proteínas. La técnica en gel de poliacrilamida permitió una mejor resolución proporcionando las cinco fracciones antes mencionadas (Figura 2).

El densitograma que ilustra la Figura 3, correspondiente al pico I de las globulinas del *L. luteus* eluídas del Sephadex G-100, revela sólo dos fracciones, en el que la primera está presente en mayor proporción (76.3o/o). Dado que el pico I estuvo constituido por las primeras proteínas que eluyeron de la columna, se podría pensar que su peso molecular estaría sobre 150,000.

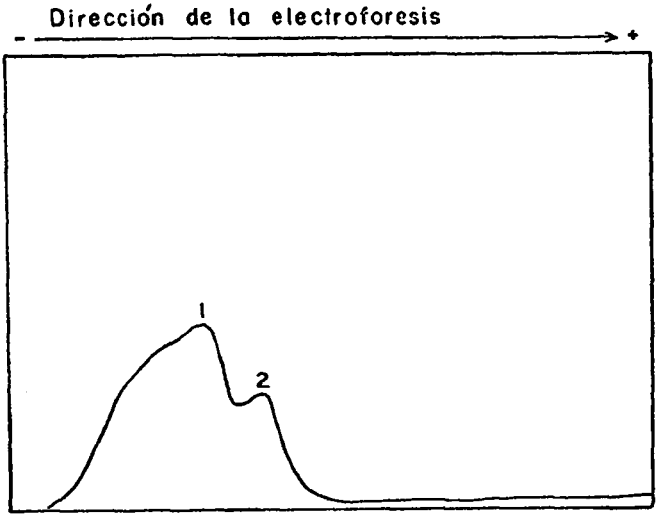

FIGURA 3

Densitograma del pico I del *L. luteus* var. Aurea/Weico

A continuación, el densitograma del pico II que se muestra en la Figura 4 señala tres fracciones, siendo la más preponderante la fracción I que representa el 50.4o/o. Es posible apreciar la gran semejanza existente entre las fracciones del pico II eluidas del Sephadex G-100 y las fracciones 3, 4 y 5 de las globulinas totales de la Figura 2.

A la luz de estos resultados, el extracto de globulinas totales estaría constituido por dos poblaciones principales distribuidas en el pico I y pico II, cuyos constituyentes se evidenciaron por la electroforesis.

La Figura 5 capta las movilidades relativas calculadas a partir de los electroforetogramas de las albúminas, globulinas, pico I y pico II del *L. luteus*, mediante la fórmula de Weber y Osborn (14). La mayor o menor cantidad de proteínas se esquematiza por la intensidad de las bandas. Según se puede apreciar en la Figura 5, las fracciones de albúminas (A) se sitúan en la parte superior del gel presentando bajos valores de movilidad relativa (0.16 – 0.50), posiblemente debido a la dimensión de la macromolécula, de acuerdo con Davis (13).

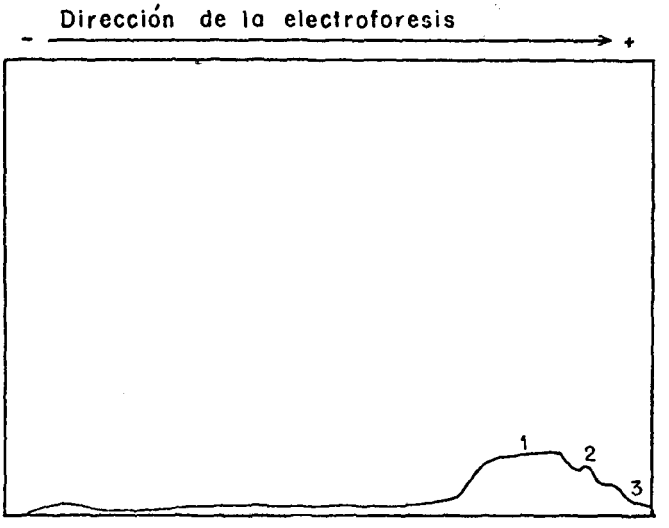

FIGURA 4

Densitograma del pico II del *L. luteus* var. Aurea/Weico

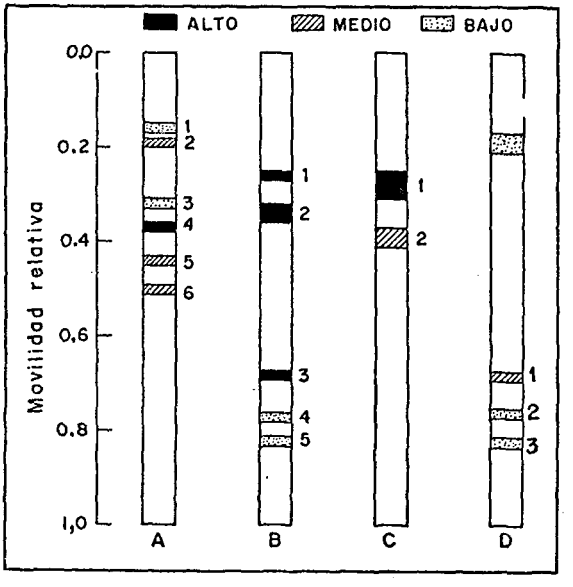

FIGURA 5

Movilidades electroforéticas relativas de albúminas (A), globulinas (B), pico I (C) y pico II (D) del *L. luteus* var. Aurea/Weico

En el caso de las globulinas totales, barra B, en la misma Figura 5, se diferencian dos agrupaciones, en la que la primera de ellas se ubica en el tercio superior, con una movilidad relativa de 0.26 y 0.34. La segunda agrupación, constituida por tres fracciones, tendría una menor dimensión molecular porque acusa una mayor movilidad relativa, o sea entre 0.68 y 0.82.

Las fracciones 1, 2 y 3 en la barra D presentan una alta movilidad; por lo tanto, sus dimensiones moleculares serían menores que las fracciones 1 y 2 en la barra C. A su vez, estas fracciones 1, 2 y 3 de la barra D son semejantes en cuanto a movilidad (0.68 a 0.82) a las fracciones de globulinas 3, 4 y 5 en la barra B.

La separación de las albúminas del *L. albus* en cuatro fracciones: 1, 2, 3 y 4, se aprecia en la Figura 6, alcanzando el mayor porcentaje (54.3o/o) la fracción 2. Por la metodología empleada en este trabajo que coincide con la línea seguida por Sgarbieri y Galeazzi (6) se llegó a separar cuatro fracciones de albúmina. En cambio, Cerletti, Fumagalli y Venturin (7), quienes efectuaron electroforesis en acetato de celulosa, encontraron cinco fracciones.

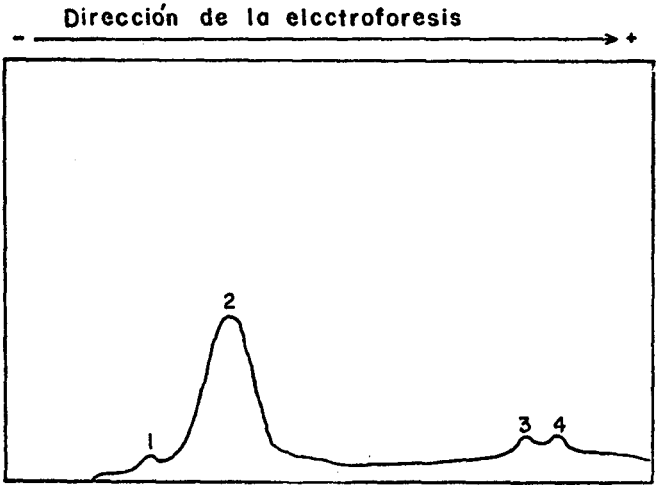

FIGURA 6

Densitograma de albúminas del *L. albus* var. Multolupa

El densitograma de globulinas separadas por electroforesis (Figura 7), permite observar la separación en cinco fracciones proteínicas, de las cuales la fracción 2 hace el mayor aporte (54.4o/o).

Respecto al fraccionamiento de las globulinas, Sgarbieri y Galeazzi (6) encontraron seis fracciones, y Cerletti, Fumagalli y Venturin (7), obtuvieron cuatro fracciones. La diversidad de resultados que se ha observado en las publicaciones señaladas podría deberse a que las metodologías

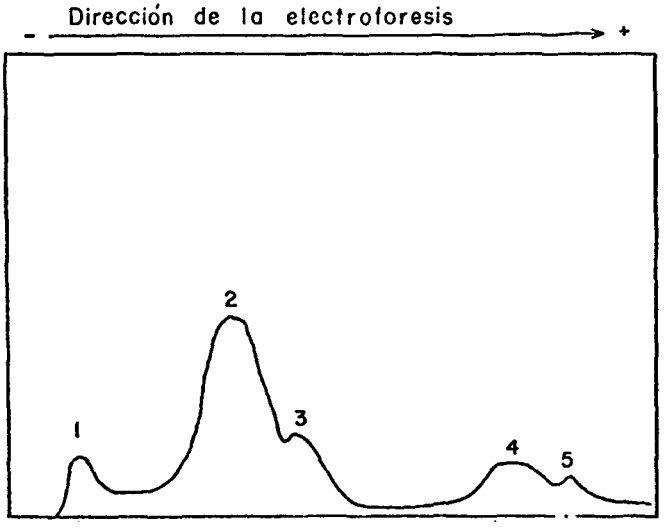

FIGURA 7

Densitograma de globulinas del *L. albus* var. Multolupa

aplicadas no fueron exactamente las mismas; las semillas empleadas provenían de diferentes programas de mejoramiento genético o bien fueron cultivadas en condiciones agronómicas diferentes.

En la Figura 8, la barra A de las albúminas señala dos agrupaciones; la superior integrada por dos fracciones de baja movilidad relativa (0.21 y 0.33), y la inferior, con dos fracciones de menor dimensión molecular cuyas movilidades son 0.79 y 0.85. Tanto las globulinas totales como las del pico I presentan gran semejanza entre sí en lo que se refiere al número y movilidad relativa de las fracciones. Las dos fracciones preponderantes (2 y 3), según se observa, acusaron movilidades relativas de 0.35 y 0.48.

Dado que el Sephadex G-100 y el G-150 no fraccionaron las globulinas del *L. albus*, se aplicó la técnica de la electroforesis con dodecil sulfato de sodio y mercaptoetanol, a fin de lograr un mayor fraccionamiento. La efectividad de esta técnica quedó demostrada al lograrse la separación de la macromolécula proteínica en sus monómeros respectivos (15).

En lo que respecta a las albúminas, del *L. albus* se obtuvieron nueve fracciones, a diferencia de las cuatro fracciones (Figura 6) logradas con la electroforesis, según Davis (13). A su vez, Sgarbieri y Galeazzi (6) encontraron siete fracciones de albúminas, y Oomah y Bushuk (10), por su parte, obtuvieron 14 fracciones.

Asimismo, se logró una mejor resolución (ocho fracciones) en la separación de la globulina del pico I comparadas con las cinco fracciones que se aprecian en la Figura 8, cuyas movilidades relativas se calcularon sobre la base de la electroforesis realizada según Davis (13). Trabajos ejecutados por Sgarbieri y Galeazzi (6) informan de 11 fracciones obtenidas por electroforesis con dodecil sulfato de sodio y a su vez, Oomah y Bushuk

(10) analizando tres cultivares de *L. albus*, evidenciaron de cinco a ocho fracciones de globulinas.

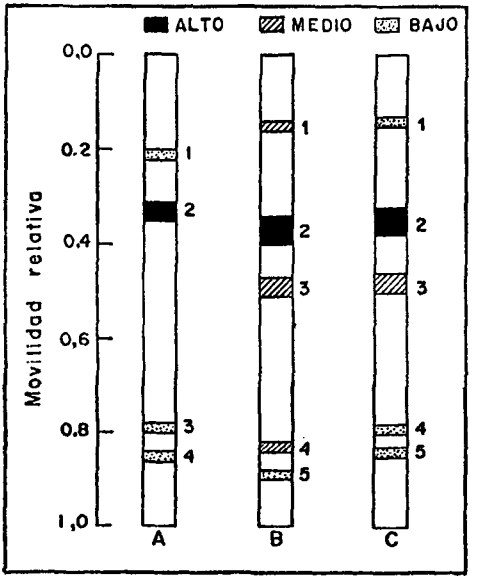

FIGURA 8

Movilidades electroforéticas relativas de albúminas (A), globulinas (B) y pico I (C) del *L. albus* var. Multolupa

La composición de aminoácidos de la harina, albúminas y globulinas del *L. luteus* y del *L. albus*, se da a conocer en la Tabla 1, respectivamente. Se observa que el contenido de lisina en la harina es más bajo que el de otras leguminosas de consumo habitual (frijol, garbanzo, lenteja y arveja). En cuanto a la metionina, los valores se asemejan, y en lo que respecta a histidina, el contenido de este aminoácido es superior al de las leguminosas ya citadas (19).

Al comparar los resultados del *L. albus* cultivado en Chile con la composición aminoacídica informada por Sgarbieri y Galeazzi para la misma especie de lupino en harina desgrasada, se observó semejanza en los valores encontrados (6). En cuanto a las proteínas fraccionadas, albúminas y globulinas los valores de aminoácidos (Tabla 1) son inferiores a lo informado por Durante y Cerletti (20).

Respecto al *L. luteus*, los datos de la literatura se refieren principalmente a la composición aminoacídica de la harina, encontrándose que los valores de *L. luteus* analizados en este trabajo son en general inferiores a los comunicados por Hove (21).

TABLA 1

COMPOSICION AMINOACIDICA DE LA HARINA DESGRASADA, ALBUMINAS Y GLOBULINAS DE LUPINO
(g de aminoácido/16 g N)

Aminoácidos	*L. luteus* var. Aurea/Weico			*L. albus* var. Multolupa		
	Harina	Albúminas	Globulinas	Harina	Albúminas	Globulinas
Esenciales						
Isoleucina	3.2	0.7	2.7	4.4	2.2	2.4
Leucina	6.1	1.1	5.9	7.1	2.4	4.1
Lisina	4.9	1.8	4.1	5.0	2.5	3.2
Metionina	0.8	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2
Cistina	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas
Fenilalanina	3.5	0.7	2.7	3.9	2.5	2.2
Tirosina	2.3	0.6	1.9	4.2	3.7	2.4
Treonina	2.7	1.0	1.9	3.8	2.0	2.0
Triptofano*	—	—	—	—	—	—
Valina	2.9	0.9	2.0	4.1	1.8	2.2
No esenciales						
Ac. Aspártico	15.0	2.6	7.9	11.4	7.2	5.9
Ac. Glutámico	22.5	5.1	23.3	20.8	14.8	12.3
Alanina	2.5	1.0	1.8	3.1	2.1	1.6
Arginina	11.1	3.3	9.2	9.4	6.8	5.4
Glicina	2.8	1.0	2.1	3.4	1.3	1.9
Histidina	4.4	Trazas	2.0	3.1	Trazas	Trazas
Prolina	3.3	0.8	3.0	3.8	2.8	2.4
Serina	3.5	0.9	3.3	4.8	3.5	2.6

* No se determinó.

CONCLUSIONES

A partir de los hallazgos que se citan, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. En las albúminas de los lupinos *luteus* y *albus* hay una fracción preponderante que representa aproximadamente el 50o/o del total de ellas. La distribución porcentual de las globulinas en el *L. luteus* acusa menor disparidad que en el *L. albus*. A su vez, las albúminas del *L. luteus* con un mayor número de fracciones son de menor movilidad relativa que las albúminas de *L. albus*.

2. En el *L. luteus* las albúminas dan un mayor número de fracciones, las cuales son de menor movilidad relativa que las del *L. albus*. Las globulinas de ambas especies con igual número de fracciones se caracterizan por presentar agrupaciones de baja y alta movilidad, respectivamente.

SUMMARY

SWEET LUPINE *(Lupinus luteus,* var. Aurea/Weico AND *Lupinus albus,* var. Multolupa) PROTEINS. II. THEIR SEPARATION BY ELECTROPHORESIS

The albumins and globulins extracted from *Lupinus luteus* var. Aurea/Weico and *Lupinus albus* var. Multolupa defatted flour samples were analyzed by polyacrilamide gel electrophoresis. The purpose was to determine the percentage distribution of pattern in the electrophoretograms and the relative mobility values of protein.

The *L. luteus* albumins densitogram showed six fractions, two of them, No. 2 and No. 4, represented 58.1o/o of the total. On the other hand, the globulins densitogram revealed five fractions, numbers 1, 2 and 3 representing 90.7o/o. The densitogram of peak I from Sephadex G-100 globulins filtration indicated two fractions similar to those number 1 and 2 of the total globulins, showing low relative mobility values (from 0.26 to 0.39). The *L. albus* albumins resolved in four fractions, with No. 2 being the most prevalent (54.3o/o). In regard to the *L. albus* globulins, these showed five fractions identical in distribution with those of peak I, fraction 2 appearing as the most important (48.2o/o). It was found that Sephadex G-100 did not perform a good separation. As to the relative mobility values of globulins, fractions 2 and 3 were the most prominent (relative mobility of 0.35 and 0.48, respectively).

It may be concluded that *L. luteus* albumins presented more components but with lower relative mobility values than those of *L. albus.* As for the globulins from both lupine flour samples, the gel separated fractions were classified in two groups of components, those of high and of low relative mobility.

AGRADECIMIENTOS

Nuestros sinceros agradecimientos a las Señoras Pilar Gómez y Eugenia Orrego, por su valiosa colaboración en la realización de este estudio, y a la Sra. Viola Lyon, por su excelente labor secretarial en la confección de este manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

1. Baer, E. Von. El lupino dulce. Antecedentes generales de cultivo y de utilización en el Sur de Chile. **Simiente, 42**(1-3): 20-24, 1972.
2. Castro, E. Lupino: cultivo y utilización. **Rev. "El Campesino"**, Vol. CIX, No. 8, Agosto, 1978.
3. Hill, G. D. The composition and nutritive value of lupin seed. **Nutr. Abstr. Revs.,** B **47**(8): 511-529, 1977.
4. Manriquez, J. & M. A. Thomas. The effect of lupin protein isolation procedures on the emulsifying and water binding capacity of a meat-protein system. **J. Fd Technol., 11**: 409-422, 1976.
5. Ruiz, L. P. & E. L. Hove. Conditions affecting production of a protein isolate from lupin seed kernels. **J. Sci. Fd Agric., 27**: 667-674, 1976.
6. Sgarbieri, V. C. & M. A. Galeazzi. Some physicochemical and nutritional properties of a sweet lupin *(Lupinus albus* var. Multolupa) protein. **J. Agric. Food Chem., 26**(6): 1438-1442, 1978.

7. Cerletti, P., A. Fumagalli & D. Venturin. Protein composition of seeds of *Lupinus albus*. **J. Fd Sci., 43**(5): 1409-1414, 1978.
8. Restani, P., M. Duranti, P. Cerletti & P. Simonetti. Subunit composition of the seed globulins of *Lupinus albus*. **Phytochem., 20**(9): 2077-2083, 1981.
9. Duranti, M., P. Restani, M. Poniatowska & P. Cerletti. The seed globulins of *Lupinus albus*. **Phytochem., 20**(9): 2071-2075, 1981.
10. Oomah, D. B. & W. Bushuk. Characterization of lupine proteins. **J. Fd Sci., 48**: 38-41, 1983.
11. King, J., C. Aguirre & S. de Pablo. Functional properties of lupin protein isolates *(Lupinus albus* cv. Multolupa). **J. Fd Sci., 59**: 82, 1985.
12. Vásquez, M., E. Knapp, E. Guzmán & I. Zacarías. Proteínas de lupino dulce *(Lupinus luteus* var. Aurea/Weico y *Lupinus albus* var. Multolupa). I. Extracción y filtración por Sephadex. **Arch. Latinoamer. Nutr., 39**(2): 150-158, 1989.
13. Davis, B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci., 121**: 404-427, 1964.
14. Weber, K. & M. Osborn. The reliability of molecular weight determination to dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Biol. Chem., 244**(16): 4406-4412, 1969.
15. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bead of bacteriophage T4. **Nature, 227**: 680-685, 1970.
16. Kohler, G. O. & R. Palter. Studies on methods for amino acid analysis of wheat products. **Cereal Chem., 44**: 512, 1967.
17. Spackman, D. H., W. H. Stein & S. Moore. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Anal. Chem., 30**: 1190-1206, 1958.
18. Joubert, F. J. Lupin seed proteins, a physicochemical study of the protein from yellow lupin seed *(Lupinus luteus). Biochem. Biophys.* **Acta, 17**: 444-446, 1955.
19. Schmidt-Hebbel, H. & M. I. Pennacchiotti. **Tabla de Composición Química de Alimentos Chilenos.** (7a. ed.), Santiago, Editorial Universitaria, 1985, 35 p.
20. Duranti, M. & P. Cerletti. Amino acid composition of seed proteins of *Lupinus albus*. **J. Agric. Food Chem., 27**(5): 977-978, 1979.
21. Hove, E. L. Composition and protein quality of sweet lupin seed. **J. Sci. Fd Agric., 25**: 851-859, 1974.