

Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grano de *Phaseolus lunatus* L.

Santiago Gallegos Tintoré, Jessé Pacheco Aguirre, David Betancur Ancona y Luis Chel Guerrero

Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida. México

RESUMEN. Las proteínas de los granos de leguminosas son fuente potencial de nutrientes valiosos, por lo cual son objeto de estudios para lograr su mejor aprovechamiento. Esto se hace más importante para aquellas proteínas provenientes de especies subexplotadas, por lo cual es necesario un conocimiento básico, previo a su utilización como ingrediente. El propósito de este trabajo consistió en determinar varias características estructurales y nutrimentales de las fracciones proteínicas de *Phaseolus lunatus*, separadas por solubilidad en diferentes agentes. La cantidad relativa de albúminas (ALB), globulinas (GLB), prolaminas (PRL) y glutelinas (GLT) fue 62,3, 34,8, 1,4 y 1,5%, respectivamente. En el perfil electroforético SDS-PAGE de las ALB y GLB se encontró siete bandas comunes en un intervalo de 10 a 95 kDa y 14 a 99 kDa, respectivamente. El perfil de aminoácidos mostró que la fracción rica en aminoácidos azufrados fue la de PRL (11,5 g/100 g proteína), encontrando el contenido de lisina, en la fracción de ALB, menor al esperado. El requerimiento de la FAO fue cubierto en las fracciones de GLB y GLT. En general el mejor balance de aminoácidos así como de digestibilidad (80%) lo presentó la fracción de GLB; sin embargo, tuvo una relación de eficiencia proteínica calculada (REP-C) de 0,11, menor que el de las ALB (0,97). El análisis calorimétrico, enseñó temperaturas de desnaturalización alrededor de 90°C para las fracciones ALB, GLB, GLU. La fracción de PRL no presentó transición térmica probablemente porque las proteínas se encontraban desnaturalizadas debido a las condiciones de extracción.

Palabras clave: *Phaseolus lunatus*, albúminas, globulinas, prolaminas, glutelinas.

SUMMARY. Extraction and characterization of soluble protein fractions from *Phaseolus lunatus* L seeds. Legume proteins as a potential source of valuable nutrients, are the object of several studies in order to obtain the best use. A basic knowledge becomes more important for those proteins from species not wholly utilized, before using them as food ingredients. The objective of this work was to determine several structural and nutritional characteristics of the protein fractions from *Phaseolus lunatus*, separated in different solvents. The relative amount of extraction for the albumins (ALB), globulins (GLB), prolamines (PRL), and glutelins (GLT) was 62,3, 34,8, 1,4 and 1,5%, respectively. The SDS-PAGE electrophoretic profile of both ALB and GLB, showed seven common bands in intervals from 10 to 95 kDa, and 14 to 99 kDa, respectively; the amino acids profile showed that PRL was the rich fraction in sulfurated amino acids (11,5 g/100 g protein); the content of lysine in the fraction of ALB was smaller than expected but the requirement of the FAO in the fractions of GLB and GLT was covered. In general, the fraction of GLB had the best balance of amino acids and digestibility (80%); however, it had a relationship of calculated protein efficiency ratio (C-PER) of 0,11, smaller than the ratio in ALB (0,97). The calorimetric analysis showed denatured temperatures around 90°C for the ALB, GLB, and GLU fractions. The PRL fraction probably did not present a thermal transition because the proteins were denaturalized by the extraction conditions. **Key words:** *Phaseolus lunatus*, albumins, globulins, prolamines, glutelins.

INTRODUCCION

Los granos de las leguminosas comestibles son en gran medida nutrimentalmente importantes, como la principal fuente de proteínas (20% al 40%) de bajo costo en la dieta del hombre. Los de *Phaseolus lunatus* se han convertido en un valioso objeto de estudio debido a su contenido de proteína cercano al 26% (1-3). Las proteínas vegetales pueden fraccionarse de acuerdo a su solubilidad, en albúminas (ALB), solubles en agua, globulinas (GLB), solubles en soluciones salinas, glutelinas (GLT), solubles en soluciones tanto ácidas como básicas y por último las prolaminas (PRL), solubles en soluciones alcohólicas (4). El método involucra diferentes

condiciones como temperatura, tiempo, concentración de proteína, pH y fuerza iónica, las cuales influirán tanto en el rendimiento de cada fracción obtenida como en la estructura de las proteínas que integran cada fracción. Por lo general, la mayor proporción de proteína en granos de leguminosas se encuentra en forma de GLB, seguida por ALB y en menor cantidad como GLT y PRL (5) y se ha encontrado que dependiendo de la proporción de cada una de las fracciones proteínicas en los granos, será la calidad nutrimental de la proteína total (6), así como las características fisicoquímicas y funcionales. En el caso de las semillas de *Vigna unguiculata*, leguminosa cultivada en el sureste de la república mexicana y poco aprovechada, como es el caso del *P. lunatus*, se ha

encontrado que cada una de las fracciones proteínicas extraídas es distinta con respecto a su composición de aminoácidos, siendo las fracciones de GLT y PRL las de más alto contenido de aminoácidos esenciales comparadas con las otras dos fracciones (6). Por ello, el tener un mayor conocimiento acerca de la variabilidad en la composición, propiedades funcionales y nutrimentales de los componentes proteínicos de las leguminosas, permitirá un mejor aprovechamiento de éstas, mediante su incorporación en sistemas alimenticios. Aún cuando se han realizado varios trabajos con *P. lunatus*, éstos han sido más bien en el ámbito tecnológico, para reducir o eliminar los efectos adversos de los componentes no nutritivos, generales y específicos, propios de las leguminosas. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar varias propiedades estructurales de las fracciones proteínicas de *Phaseolus lunatus*, separadas mediante diferentes disolventes.

MATERIALES Y METODOS

Fraccionamiento de las proteínas de la harina

Se utilizaron 10 KK de granos de *P. lunatus* provenientes de la cosecha de febrero de 2000 del municipio del ejido La Libertad en Escárcega; Campeche, México. Los granos se limpiaron manualmente, se molieron a través de un molino Mikrós (malla 20), y posteriormente con un molino Cyclotec 1093 (Tecator Sweden) para la obtención de una harina más fina (malla 60). La extracción de las fracciones de ALB y GLB se llevó a cabo utilizando una modificación del método reportado por Barba de la Rosa et al. (7) de la siguiente manera: se preparó una dispersión de 50 g de harina de *P. lunatus* con una solución de Na_2HPO_4 0,05 M + NaCl 0,4 M + K_2SO_4 0,1434 M (1:1:1), en una relación 1:15 de harina / disolvente durante 1 h de agitación, centrifugando posteriormente a 15,805 xg durante 45 min, a 20°C. El sobrenadante (que contiene las fracciones de ALB y GLB) se dializó con agua destilada a 4°C hasta que la conductividad del agua de diálisis fuera cercana a su valor original. Posteriormente se centrifugó para separar la fracción de ALB (solubles) de la de GLB (insolubles). Ambas fueron secadas por liofilización a -45°C durante 24 h, en un equipo LABCONCO (No. 77510-00). El residuo de la extracción de ALB y GLB, se dispersó con isopropanol al 70% para la extracción de PRL, empleando una relación soluto / disolvente de 1:15, con 1 h de agitación, posteriormente se evaporó al vacío a 50°C y se secó por liofilización. La extracción de GLT se llevó a cabo dispersando el residuo de la extracción de PRL con una solución de NaOH 1 M a una relación 1:15 de soluto / disolvente, agitando durante 1 h. Posteriormente esta suspensión se centrifugó bajo las mismas condiciones que para el caso de ALB y GLB. El sobrenadante se dializó en un cuarto frío a una temperatura de 4°C, como

en el caso anterior y se centrifugó para la obtención de la fracción de GLT, la cual se secó por liofilización.

Se calculó el porcentaje de proteína extraída en cada fracción, utilizando la siguiente relación:

$$(\text{g de proteína extraída en la fracción} / \text{g de proteína en la harina}) \times 100$$

El contenido proteínico de la harina de *P. lunatus*, se calculó por el método de kjeldahl según la metodología de la A.O.A.C (14), empleando el factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6,25.

Cuantificación de proteína

El contenido de proteína de las fracciones se cuantificó mediante el método de Lowry et al. (8) con un kit de SIGMA (L-1013). Se pesaron de 1 a 4 mg de cada fracción dependiendo de la concentración de proteína en la muestra. Se agregó a cada tubo 500 μL de NaOH 1 N + 500 μL de agua destilada, se agitaron las muestras en un vórtex y se calentaron a baño María durante 1 min. Luego de 30 min se agregó a cada tubo 1 mL de reactivo preparado con 50 mL de Na_2CO_3 al 2% y 1 mL de reactivo B (CuSO_4 al 0,5% en tartrato de sodio y potasio al 1%), se dejó reaccionar 10 min, se agregaron 100 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma F-9252) diluido al 50% y se dejó reaccionar 30 min antes de leer la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman Mod. DU 650.

Como patrón se empleó una solución de albúmina sérica bovina (Sigma A-8531) a la concentración de 0,4 mg/mL.

Análisis fisicoquímico

A las fracciones obtenidas se les realizaron las siguientes determinaciones:

a) Calorimetría diferencial de barrido (CDB), de acuerdo con la metodología reportada por Martínez y Añón (9). Se pesaron 3 mg (b.s.) de muestra y se suspendieron en 10 μL de agua desionizada (30%). Se emplearon cápsulas herméticas (Perkin-Elmer No. 0219-0062), dejando estabilizar las muestras por lo menos 30 min a temperatura ambiente (25°C) y realizando la corrida con un equipo Perkin Elmer DSC-6 Pyris, programado con un flujo de calentamiento de 10°C /min en un intervalo de 35 a 130°C.

b) Electroforesis según Laemmli, (10). Se utilizaron como estándares proteínas de 103, 76, 49, 33,2, 28 y 19,9 kDa marca Bio-Rad y geles de poliacrilamida al 12,5%. El volumen de muestra inyectado fue de 5 a 10 μL dependiendo de la concentración de proteína en la muestra. El análisis electroforético se realizó con una corriente constante de 8-10 V/gel durante 5 h. Al término de ésta, los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie G-250 (Fluka 27815) al 0,1% en agua: metanol: ácido acético en relación 4:1:5 (v/v /v) durante 1 h. Posteriormente fueron decolorados

utilizando una mezcla de agua - ácido acético - metanol en relación 5:1:2 (v / v / v) durante 12 h.

Evaluación nutricional

a) Perfil de aminoácidos, de acuerdo con el método de Khayat et al. (11), excepto el triptófano que se determinó según Dávila y Martínez (12).

Para el primer caso las muestras se hidrolizaron a vacío utilizando una solución de HCl 6 N durante 22 h a una temperatura de 110°C. Posteriormente el ácido se desechó y tanto las muestras hidrolizadas como el estándar interno de norleucina fueron tratadas con cloruro de dansilo. A continuación se tomaron 20 µL de las muestras y se inyectaron en una columna Lichrosorb C₁₈ (4,6mm de diámetro interno x 250 mm de longitud, con un tamaño de partícula de 5µm) empleando acetonitrilo con 4 mL de H₃PO₄ al 5% por litro, así como Na₂HPO₄ 31 mM pH 7,6 para la elución de las muestras. El análisis cromatográfico se realizó a temperatura ambiente y con una velocidad de flujo de 1 mL/min, el gradiente de acetonitrilo utilizado fue de 30 a 80%. Se utilizó un equipo HPLC (Waters, Milford, MA, EUA) integrado por un controlador mod. 600E, un inyector automático WISP mod. 712 y un detector UV-VIS. Los aminoácidos fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los estándares dansilados marca Sigma (A-9656) y fueron cuantificados de acuerdo con el método de estándar interno.

Para la determinación de triptófano se preparó una curva estándar a partir de una solución patrón de 100 µg / mL del aminoácido Sigma (T-0254) en NaOH 1N. Se pesaron 10 mg de muestra y se pasó a tubos de ensaye de 20 mL, a cada uno de los tubos se le agregó 2,5 mL de solución de p-DMABA (p - dimetilaminobenzaldehído) Sigma (D-2004) al 0,05 % en agua destilada y posteriormente 11 mL de H₂SO₄ al 60%; se preparó un testigo que no contenía muestra. Los tubos se agitaron en un vórtex y se colocaron en la oscuridad durante 17 h. Posteriormente, se agregó a cada tubo 0,1 mL de nitrito de sodio al 0,05 % y se dejó reaccionar durante 30 min. Finalmente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 590 nm.

b) Digestibilidad *in vitro* según Hsu et al. (13). Se prepararon 50 mL de una suspensión acuosa de material proteínico (molido y tamizado por una malla 80 con concentración de 6,25 mg/mL) y se ajustó el pH a 8 con HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N con agitación en un baño de agua a 37°C. Se prepararon 50 mL de una solución multienzimática que contenía una mezcla de tripsina (tipo IX Sigma T-0134 con 14.190 unidades BAEE/mg de proteína), quimotripsina (tipo II Sigma C-4129 con 60 unidades/mg de polvo) y peptidasa (grado III Sigma P-75000 con 40 unidades/g de polvo) por mL, se ajustó a pH 8 y esta solución se mantuvo en un baño de hielo. Una vez efectuado lo anterior, se añadieron 5 mL a la suspensión proteínica que se mantuvo

en agitación a 37°C. Se midió la caída de pH con un potenciómetro digital después de un período de 10 min. Se calculó la digestibilidad aparente *in vitro* (Y) a partir de la ecuación:

$$Y = 210,464 - 18,103X$$

Donde: X = pH de la suspensión proteínica inmediatamente después de 10 min de digestión con la solución multienzimática.

c) Cómputo químico corregido. Se calculó primeramente el cómputo químico según Friedman (14), empleando como referencia el patrón FAO / OMS (1991) para niños de 2 a 5 años; de acuerdo con la siguiente relación:

mg de aminoácidos indispensables en 1 g de la proteína evaluada/mg de aminoácido en 1 g de la proteína de referencia. El cómputo químico corregido se obtuvo multiplicando éste valor por la digestibilidad *in vitro* de la fracción proteínica, para cada aminoácido esencial.

d) REP-C (Relación de eficiencia proteínica calculada) de acuerdo con el método de la AOAC (15). Se utilizó el valor de digestibilidad *in vitro* y la cantidad (g) de aminoácido (AA)/100 g proteína de los siguientes: Lys, Met+Cys, Thr, Ile, Leu, Val, Phe+Tyr y Trp, considerando que en la combinación de Met+Cys y/o Phe+Tyr, el valor de la Cys y de la Tyr no pueden ser mayores al 50% de la suma total entre Met+Cys o Phe+Tyr, respectivamente.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de una vía para el caso de las temperaturas y entalpías de desnaturalización, así como para la DIV y el REP-C, considerando como tratamientos a las diferentes fracciones. Posteriormente se efectuó una comparación múltiple de medias por medio de la prueba de Tukey de acuerdo con los métodos de Montgomery (16).

RESULTADOS Y DISCUSION

Fraccionamiento proteínico

El contenido de proteína en la harina de *P. lunatus* fue de 20,8%. La cantidad de proteína extraída para las cuatro fracciones se presenta en la Tabla 1. La fracción de albúminas (ALB) tuvo el mayor porcentaje relativo de 62,3, seguido por el de globulinas (GLB) con 34,8%. Este patrón difirió significativamente con el reportado por Gallegos (17), de 36% y 44% para las respectivas fracciones, quien trabajó con el mismo material, aunque previamente desgrasado y empleando como disolvente agua y cloruro de sodio al 10%, para la extracción secuencial de ALB y GLB respectivamente. Además del tipo de disolvente, también existe evidencia de que dependiendo del orden en que éstos se añadan puede

influir en los resultados. Este es el caso del amaranto, ya que una fracción denominada ALB 2 puede aparecer en la fracción de GLB o en la correspondiente a las GLT (18).

TABLA 1
Proporción de las fracciones proteínicas de la harina de *P. lunatus*

Fracciones	Proteína extraída (mg)	Proteína extraída (%)	% relativo
ALB	2746.7	26.4	62.3
GLB	1535.2	14.8	34.8
PRL	62.8	0.6	1.4
GLT	66.6	0.6	1.5
TOTAL	4411.3	42.4	100.0

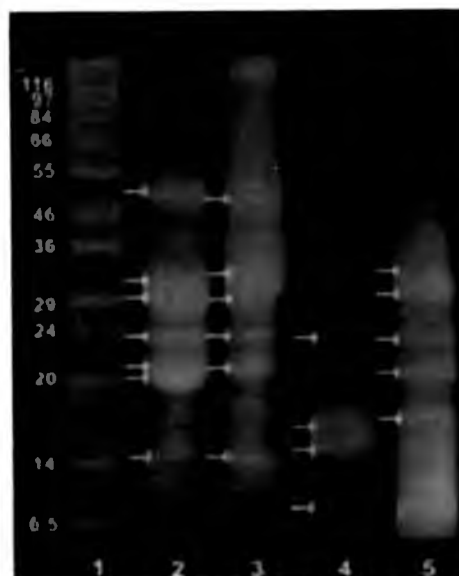
Es sabido que ciertos factores como el tamaño de partícula de la harina, la fuerza de agitación, la relación harinadisolvente, el número de extracciones por etapa, así como el estado fisiológico de la semilla, influyen en la proporción de las diferentes fracciones (19, 20). Esos factores, influyeron en la recuperación total de la proteína de *P. lunatus*, la cual fue de aproximadamente 42%, siendo menor al encontrado por Pereira y Costa (21) y Marquez y Lajolo (22) en *Phaseolus vulgaris* con rendimientos de extracción de 61,7% y 76% respectivamente. En estos trabajos se utilizó el método de Osborne (4) con algunas modificaciones, los primeros empleando una extracción secuencial de albúminas y globulinas y los segundos con extracción independiente de estas fracciones. Por otro lado Nikokyris y Kandylis (5), emplearon diferentes métodos para fraccionar las proteínas de 20 vegetales, entre cereales y leguminosas, encontrando una recuperación de proteína entre el 42% y 96%, dependiendo de la fuente vegetal, correspondiendo los menores valores a los casos en que se empleó el desgrasado.

Caracterización electroforética

En el análisis electroforético SDS - PAGE (Figura 1) se encontró para la fracción de ALB un número de bandas (quince) similar a la de GLB (catorce) teniendo mayor presencia siete de ellas en ALB (señaladas con flechas, Figura 1.2) con Masa molecular (MM) de 50, 33, 30, 24, 22, 20 y 14 kDa, seis en GLB con 57, 32, 24, 20, 18 y 14 kDa similares a las reportadas para *L. mutabilis sweet* (58,1, 33, 24,4, 19,3, 17,5, 14,9 kDa) (23). Las MM de los polipéptidos de las albúminas fueron similares a los encontrados en 6 variedades de garbanzo (10 a 91 kDa) estudiadas por Dhawan et al. (24). En el caso de las GLB se hallaron catorce bandas con MM entre 14 y 116 kDa de las cuales seis tuvieron mayor intensidad, éstas con MM de 49, 34, 31, 24, 21 y 14 kDa

(señaladas con flechas, Figura 1.3) algunas de ellas similares a las halladas por Acuña et al. (23) en *L. mutabilis sweet* (118,6, 63,9, 50,6, 47,8, 39,4, 33,6, 18,7, 14,9 kDa). Comparando los patrones electroforéticos de ambas fracciones, se pudo notar que por lo menos siete de las bandas presentaron una diferencia menor a 1 kDa, lo cual posiblemente indicó una separación deficiente de las proteínas.

FIGURA 1
Perfil electroforético SDS-PAGE de las fracciones proteínicas de *P. lunatus*. 1: Estándar, 2: ALB, 3: GLB, 4: PRL, 5: GLT



En la fracción de PRL se identificaron bandas con MM de 22, 17, 16 y 7 kDa (señaladas con flechas, Figura 1.4) de las cuales solamente una, la de 22 kDa, se ha reportado en la misma fracción en otro trabajo realizado con *P. lunatus* en harina desgrasada (17), con lo que se puede suponer que el disolvente influyó significativamente en la estructura y composición de las proteínas como sugieren Shewry y Mifflin (20), de tal manera que se modifica su solubilidad. La fracción de glutelinas GLT presentó cinco bandas con MM de 34, 31, 24, 21 y 17 kDa (señaladas con flechas, Figura 1.5). Además tuvo dos bandas tenues (45 y 31 kDa) y una de más de 116 kDa, así como una serie de bandas indefinidas con pesos menores a la de esta última.

Evaluación nutricional

Perfil de aminoácidos

El contenido de aminoácidos en las fracciones de ALB y GLB fue similar a lo reportado por Oshodi y Adeladum (2),

a excepción de la prolina (11,1 y 0,6 g/100g de proteína, respectivamente), que también se encontró en forma importante en la fracción de GLT (12,6 g/100 g de proteína). Contrariamente a lo reportado en la mayoría de las leguminosas (25), la fracción que resultó rica en aminoácidos azufrados fue la de prolaminas (PRL) (11,5 g/100 g proteína) en vez de las ALB (1,7 g/100 g proteína), cuyo contenido fue similar al encontrado para GLT (1,6 g/100 g proteína). El requerimiento de azufrados sugerido por la FAO (26), se observó cubierto, solamente en el caso de las PRL (11,5 g/100 g proteína), fracción en la cual se encontró una cantidad importante de ellos, aproximadamente 7 veces mayor que en la fracción correspondiente de *V. unguiculata* (Tabla 2) otra leguminosa subexplotada de las regiones tropicales del Sureste Mexicano.

El contenido de Lys en las ALB resultó menor que el esperado, pues se sabe que generalmente esta fracción es rica en este aminoácido (27); sin embargo, el requerimiento fue cubierto en las fracciones de GLB y GLT. En lo que respecta al contenido de Trp las cuatro fracciones proteínicas tuvieron valores menores a los recomendados por la FAO (26). En general, el mejor balance de aminoácidos esenciales lo tuvo la fracción de GLB, aunque en aminoácidos azufrados, fue la que en menor proporción los contuvo (Tabla 2); esto a diferencia de otra leguminosa como *Phaseolus mungo* (28), en donde la fracción de ALB mostró un mejor balance. Sin embargo, para el caso de *V. unguiculata* no se encontró diferencia en cuanto al aporte de aminoácidos entre ambas fracciones proteínicas (6).

TABLA 2
Composición de aminoácidos de las fracciones proteínicas de *P. lunatus* con las de *V. unguiculata* (g/100g de proteína)

Aminoácidos	ALB		GLB		PRL		GLT		Requerimiento FAO (1991)
	Pl	Vu	Pl	Vu	Pl	Vu	Pl	Vu	
Esenciales									
Lys	4,8	9,17	6,4	8,16	3,8	8,99	6,3	7,58	5,8
Trp	1,0	Nd	0,8	Nd	0,5	Nd	0,8	Nd	1,1
Phe + Tyr	10,0	8,10	11,2	9,15	5,2	10,36	10,4	11,53	6,3
Met + Cys	1,7	1,02	0,9	1,12	11,5	1,73	1,6	1,41	2,5
Thr	3,0	5,33	4,7	3,39	3,4	4,23	3,4	3,91	3,4
Leu	9,4	7,07	9,7	8,65	2,9	9,61	9,9	9,09	6,6
Ile	5,0	4,48	4,4	4,67	3,2	4,84	4,3	5,23	2,8
Val	4,1	5,04	5,4	5,21	2,5	6,62	4,4	6,34	3,5
No esenciales									
Asp + Asn	19,5	11,79	20,5	11,67	16,4	9,11	14,3	11,76	
Glu + Gln	12,2	12,11	11,8	16,51	11,6	11,07	12,0	17,24	
Ser	7,6	4,82	8,8	5,22	6,3	5,16	6,3	5,66	
His	1,7	2,96	1,6	3,76	2,2	3,65	2,0	3,72	
Gli	2,5	7,57	3,7	4,48	1,7	5,55	3,5	4,30	
Arg	4,1	7,69	5,5	7,87	17,3	5,87	4,9	4,89	
Ala	3,3	8,88	4,8	6,81	4,3	9,82	4,3	4,26	
Pro	11,1	3,98	0,6	3,33	7,7	3,39	12,6	3,08	

Nd: No determinado Pl: *P. lunatus* Vu: *V. unguiculata* (6).

Digestibilidad *in vitro*

La digestibilidad *in vitro* en las fracciones proteínicas de *P. lunatus*, resultó ligeramente baja con respecto a la harina cruda de *P. lunatus* reportada por Pérez (29) con 72,42%. La mayor digestibilidad *in vitro* (DIV) se obtuvo en las GLB (80%) equivalente a la reportada para *Phaseolus vulgaris* (79%) (30) y más alta que la encontrada *in vivo* para las GLB de haba (*Vicia faba*) con cerca del 70% (31). Los valores de las otras tres fracciones fueron muy similares y estadísticamente iguales entre si ($p > 0,05$) y todas con menor digestibilidad ($p < 0,05$) que la de GLB (Tabla 3). También en la leguminosa *Canavalia ensiformis*, se ha reportado (32) una mejor digestibilidad para la fracción de GLB (65,2%) que para las ALB (58,9%) y GLT (37,2%), la cual dependió del genotipo evaluado. Sin embargo, en todos los casos los valores fueron menores que los encontrados en el presente trabajo para las fracciones correspondientes de *P. lunatus*, siendo de 69, 67 y 66% para albúminas, glutelinas y prolaminas respectivamente. Esta diferencia en digestibilidad puede estar asociada a la estructura de las proteínas, ya que al tener ligeras diferencias en estructura terciaria y cuaternaria presentan diferente susceptibilidad a las enzimas proteolíticas (33), las cuales también pueden ser diferentes, acordes con la metodología de evaluación empleada.

Considerando en conjunto el aporte de aminoácidos esenciales y el valor de DIV, a través del REP-C (Tabla 3) se tuvo una mejor idea del valor nutritivo de cada una de las fracciones, ya que las PRL tuvieron el menor valor de este parámetro (-1,44) indicativo de una proteína de muy baja calidad (14), debido al alto desbalance de sus aminoácidos esenciales; siendo mejores y estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) en orden ascendente las ALB (0,97), GLT (0,53) y GLB (0,11). Un valor similar se informa para las ALB de *P. mungo* (1,13), aunque mejores resultados para las demás fracciones (1,27 y 1,34 y 1,53 para GLB, GLT y PRL, respectivamente), de acuerdo con Padhye y Salunkhe (28). Sin embargo, este valor de REP-C fue dependiente del método de cálculo, ya que también estos mismos autores (28) informaron valores de 0,38; 0,21; -0,14 y -0,42 para PRL, ALB, GLT y GLB respectivamente.

El mejor cómputo químico corregido para la Lis lo tuvo la fracción de GLB con 88%, siendo en general ésta la que presentó los mejores valores para casi todos los aminoácidos esenciales, obteniéndose el valor más bajo en la fracción de PRL (Tabla 4). Esta presentó también el menor cómputo químico corregido para Trp con un valor de 30%, siendo el más alto para ALB con 62%. Como es de esperarse en las proteínas de leguminosas, los aminoácidos azufrados en todas las fracciones, con excepción de la PRL con 304%, fueron los que arrojaron los menores valores de este parámetro, siendo de 54%, 47% y 43% respectivamente para GLB, ALB y GLT. Sin embargo, considerando el perfil de aminoácidos

reportado en la base de datos ESHA (34) y los valores de digestibilidad según Pérez (29), para la harina de *P. lunatus*, que incluye a todas las fracciones proteínicas, el valor del REP-C mejora para los azufrados hasta 69% y para el Trp hasta 78%, seguidos por Lys (84%) y Thr (92%), teniendo los demás aminoácidos esenciales calificaciones de más del 100%. Esto es un indicativo, de que las fracciones mayoritarias encontradas en la harina de *P. lunatus* (ALB y GLB), son las que proporcionarían un mejor valor nutritivo.

TABLA 3
DIV y REP-C de las fracciones proteínicas de *P. lunatus*

Fracción proteínica	DIV %		REP-C <i>P. lunatus</i>
	<i>P. lunatus</i>	<i>C. ensiformis</i> (26)	
ALB	68,7 ^b	58,9	0,97 ^a
GLB	80,0 ^a	65,2	0,11 ^c
PRL	66,0 ^b	Nr	-1,44 ^d
GLT	67,4 ^b	37,3	0,53 ^b

Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística (p<0,05)

Nr: no reportado, DIV: Digestibilidad *in vitro* REP-C: Relación de eficiencia proteínica calculada

TABLA 4
Cómputo químico corregido (%) de las fracciones proteínicas de *P. lunatus*

Aminoácido	ALB	GLB	PRL	GLT
Lys	57	88	43	73
Trp	62	58	30	49
Phe + Tyr	109	142	54	111
Met + Cys	47	54	304	43
Thr	61	111	66	67
Leu	98	118	29	101
Ile	123	126	75	103
Val	80	123	47	85

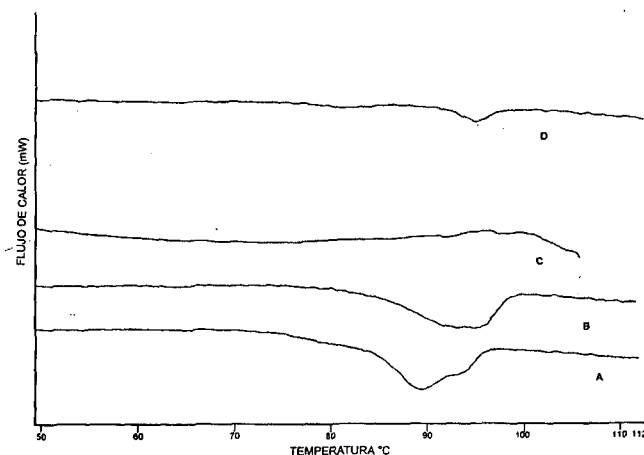
Calorimetría de barrido diferencial (CBD)

El análisis térmico indicó que la temperatura más alta de desnaturalización (Td) se encontró en la fracción de GLT (94°C) obteniéndose un valor similar aunque estadísticamente diferente (p<0,05) para GLB con 93,4°C y menor (p<0,05) respecto de ambas para ALB con 89,4°C (Figura 2). Las entalpías de desnaturalización presentaron valores de 1,5 ± 0,3 J/g, 14,3 ± 0,9 J/g y 23,7 ± 1,3 J/g, para GLU, GLB y ALB respectivamente, siendo todos los valores estadísticamente diferentes (p<0,05). El termograma de las ALB mostró un pequeño hombro (Figura 2, A) que pareció

corresponder por su valor de Td al de GLB, probablemente reflejando una asociación entre estas proteínas. La Td de GLB fue similar a la reportada para GLB de soya con 91°C (35), mostrando la posible existencia de más de una especie proteínica debido a su baja cooperatividad (más de 8°C) mayor que la calculada para las ALB (menos de 7°C). Debido a las altas temperaturas de desnaturalización que se encontraron, es muy probable que la conformación de los componentes de estas fracciones esté estabilizada por un gran número de interacciones hidrofóbicas, las cuales son de naturaleza endotérmica y por lo tanto, es requiere una mayor cantidad de energía para su desnaturalización (36). La fracción correspondiente a PRL no presentó transición térmica (Figura 2C) probablemente porque las proteínas se encontraban desnaturalizadas a causa de las condiciones de extracción.

FIGURA 2

Termogramas de las fracciones proteínicas de *P. lunatus*, A) albúminas, B) globulinas, C) prolaminas y D) glutelinas



CONCLUSIONES

La fracción con mayor presencia fue la de albúminas (ALB) con una presencia relativa de 62,3%, seguida por la de globulinas (GLB) con 34,8%. El perfil electroforético mostró en las ALB siete bandas mayoritarias con pesos entre 14 y 50 kDa y en las GLB catorce polipéptidos entre 14 y 116 kDa. Se hallaron varias bandas comunes entre ellas probablemente debido a una separación incompleta de las fracciones durante el fraccionamiento.

En general el mejor balance de aminoácidos esenciales se presentó en la fracción de GLB. La fracción que resultó rica en aminoácidos azufrados fue la de prolaminas (PRL) (11,5 g/100 g proteína) en vez de las ALB (1,7 g/100 g proteína), cuyo contenido fue similar al encontrado para

glutelinas (GLT) (1,6 g/100 g proteína), de tal manera que el requerimiento de azufrados sugerido por la FAO, se observó cubierto, solamente en el caso de las PRL (11,5 g/100 g proteína). El cómputo químico corregido global resultó de 54, 47 y 43% para el caso de GLB, ALB y GLT, que correspondieron a los aminoácidos azufrados y en el caso de las PRL fue de 29 debido a Leu. El contenido de aminoácidos indicó que las fracciones mayoritarias tuvieron diferencias importantes en el contenido de prolina, que fue de 12,2 y 1,6g/100 g de proteína para ALB y GLB, respectivamente.

La digestibilidad *in vitro* en las fracciones proteínicas de *P. lunatus* (66 a 69% resultó menor comparada con respecto a la de la harina cruda de *P. lunatus* con 72,42%, excepto la de las GLB con un 80%. Las PRL tuvieron el menor valor de REP-C (-1,44), siendo mejores en orden ascendente las ALB (0,97), GLT (0,53) y GLB (0,11), correspondiendo éstas a proteínas de baja calidad, excepto las ALB que resultan de calidad mediana, similar a la reportada para *P. mungo*.

En el análisis térmico, el termograma de las ALB mostró un pequeño hombro que pareció corresponder por su valor de Td al de GLB, probablemente reflejando una asociación entre estas proteínas. La Td de GLB fue similar a la reportada para GLB de soya con 91°C. La fracción de PRL no presentó transición térmica probablemente por que las proteínas se encontraban desnaturalizadas debido a las condiciones del método de extracción.

REFERENCIAS

1. Apata DF, Ologhobo AD. Biochemical evaluation of some Nigerian legume seeds. *Food Chem* 1994; 49: 333-338.
2. Oshodi AA, Adeladun MOA. Proximate composition, some nutritionally valuable minerals and functional properties of three varieties of lima bean (*Phaseolus lunatus* linn.) flour. *Int J Food Sci Nut* 1993; 43: 181-185.
3. Sullivan GH, Davenport LR. Dry edible beans: a New crop opportunity for the east north central region. En: Janick J, Simon JE. Editors. *New Crops*. New York Wiley, 1993. p. 585-588.
4. Osborne TB. *The vegetable protein*. New York. Longmans Green and Co. 1924.
5. Nikokyris PN, Kandyli K. Feed protein fractions in various solvents of ruminant feedstuffs. *J Sci Food Agric*. 1997; 75: 198-204.
6. Chan Chi-Wa y Philips RD. Amino acid composition and subunit constitution of protein fractions from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *J Agric Food Chem* 1994;42:1857-1860.
7. Barba De La Rosa A, Guéguen J, Paredes-López O, Viroben G. Fractionation procedures, electrophoresis characterization, and amino acid composition of amaranth seeds proteins. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 931-936.
8. Lowry OH, German B, Kinsella JE. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *J Food Sci* 1985; 50: 1715-1718.
9. Martínez EN, Añon MC. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 2523-2530.
10. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 217: 680-685.
11. Khayat A, Peter K, Redenz Y, Lee AG. Quantitative determination of amino acids in food by high-pressure liquid chromatography. *Food Tech* 1982; 48: 46-50.
12. Dávila OG y Martínez AA. Caracterización de compuestos nutritivos, no nutritivos y calidad proteica. Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo (CYTED). Editorial Universitaria de Buenos Aires. 2000; pp. 89 - 91.
13. Hsu H, Vavak D, Satterlee L, Miller GA. Multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J Food Sci* 1977; 42: 1269-1279.
14. Friedman M. Nutritional value of proteins from different food sources: A Review. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 6-29.
15. Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.). *Official Methods of Analysis*. 15th Ed. Washington D.C. 1990; 684.
16. Montgomery DC. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Editorial Iberoamericana. México. D.F. 1996; p. 277-421.
17. Gallegos TS. Perfil electroforético de las fracciones proteínicas de *Canavalia ensiformis* y *Phaseolus lunatus* [Tesis de licenciatura]. Mérida, Yucatán, México; Universidad Autónoma de Yucatán: 2000.
18. Martínez EN, Castellani OF, Añon MC. Common molecular features among amaranth storage proteins. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 3832-3839.
19. Pernollet JC, Mossé J. Structure and location of legume and cereal seed storage proteins; seed proteins. Daussant, J; Mossé, J. and Vaughan, J. (Editores). London: Academic Press: 1983. p. 156-229.
20. Shewry PR, Mifflin BJ. Seed storage proteins of economically important. En: Pomeranz . editor. *Cereals Advances in Cereal Science and Technology*. USA 1985.
21. Pereira CA y Costa NM. Proteins of dehulled black beans: digestibility in conventional and germ free animals. *Rev. Nutr* 2002; 15(1):5-14.
22. Marquez UM, Lajolo FM. Composition and digestibility of albumin, globulins, and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem*; 29:1064-1074.
23. Acuña O, Castillo P, Orbea M, Cherrez, M, Guerrero, M. Fraccionamiento de proteína de lupino por solubilidad y determinación de pesos moleculares (*Lupinus mutabilis sweet*). Simposio Iberoamericano sobre proteínas para alimentos (CYTED). Buenos Aires, Argentina; 1996. p. 239 - 49.
24. Dhawan K, Malhotra S, Dahiya BS, Singh D. Seed protein fractions and amino acid composition in gram (*Cicer arietinum*). *Plant Foods Human Nutr* 1991; 41:225-232.
25. Guéguen J, Cerletti P. Proteins of some legume seeds: soybean, pea, faba bean and lupin. En: Hudson JF (Editor) *Chapman Hill*; 1994. p. 145-197.

26. FAO/WHO. Protein quality evaluation. REPORT of joint FAO/WHO expert consultation. Food and nutrition. Paper No.51. Food Agriculture Organizations and the World Health Organization. Rome, Italy; 1991.
27. Sánchez V, Clemente A, Vioque J, Bautista J, Millán F. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum L.*): chemical composition, functional properties and protein characterization. Food Chem 1999; 64:237-243.
28. Padhye VW, Salunkhe DK. Biochemical studies on black gram (*Phaseolus mungo L.*) seeds: amino acid composition and subunit constitution of fractions of the proteins. J Food Sci 1979; 44:606-610.
29. Pérez, VM. Caracterización fisicoquímica y funcional de concentrados proteicos de *Phaseolus lunatus* y *Canavalia ensiformis*. Tesis de maestría, Facultad de ingeniería química. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México; 1999.
30. Del Pino VH, Lajolo FM. Efecto inhibitorio de los taninos del frijol carioca (*Phaseolus vulgaris L.*) sobre la hidrólisis de la faseolina por dos sistemas multienzimáticos. Simposio iberoamericano sobre proteína para alimentos, Buenos Aires, Argentina, 1996. p. 169.
31. Carbonaro M, Grant G, Cappelloni M, Pusztai AX. Perspective into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: antinutritional compounds of storage proteins. J Agric Food Chem 1992; 48:742-749.
32. Ramírez MA y Ortiz de BL. Estudio de algunas características de las proteínas de canavalia. Arch Latinoam Nut 2000; 50(1): 69-73.
33. Deshpande SS, Damodaran S. Conformational characteristics of legume 7S globulins as revealed by circular dichroic, derivative U.V. absorption and fluorescence techniques. Int J Pept Protein Res 1990; 35:25-34.
34. ESHA. Genesis for windows. Databases. ESHA research, Salem; 1997.
35. Scilingo AA, Añon MC. Calorimetric study of soybeans protein isolates: effect of calcium and thermal treatments. J Agric Food Chem 1996; 44: 3751-3756.
36. Myers CD. Study of thermodynamics and kinetics of protein stability by thermal analysis. En: Thermal analysis of foods. New York, Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1990; p.16-50.

Recibido: 22-04-2003

Aceptado: 13-01-2004