

CALIDAD BIOLÓGICA DEL AISLADO PROTEINICO DE HOJAS DE *Atriplex numularia*¹

Sara I. L. de Mucciarelli,² José A. Cid,³ Mirta A. L. de Arellano,³
Silvia Fernández,³ Norma G. de Lúquez³ y Mario A. Cbirino³

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia,
Universidad Nacional de San Luis, República Argentina

RESUMEN

En las dos últimas décadas se ha puesto de manifiesto la importancia de las proteínas foliares, demostrándose que éstas tienen una composición aminoacídica muy bien equilibrada.

El objeto del presente estudio fue evaluar la calidad biológica de la proteína de hojas de *Atriplex numularia*. Las hojas frescas de *A. numularia* acusan un contenido proteínico de 4.70 g/100 g, y 18.70 g/100 g de materia seca. A partir de hojas frescas se obtuvo un concentrado proteínico (CP), mediante pulpeado de las hojas, previamente maceradas en solución de sulfito de sodio al 20/o, a un pH de 10, filtrado y prensado. El extracto vegetal se llevó al pH de 3.5 y se procedió a coagular la proteína por inyección de vapor a temperatura de 75-80°C. Se obtuvo un producto pardo verdoso con un contenido de proteína de 55.42 g/100 g.

El análisis de aminoácidos reveló que la proteína tiene un equilibrio que la hace similar a las proteínas de origen animal, que contiene 8.5 g/16 gN de lisina y 3.0 g/16 gN de metionina, respectivamente. Se evaluó el aprovechamiento de nitrógeno mediante ensayos biológicos, habiéndose obtenido los valores siguientes: utilización proteínica neta (NPU) = 48.3 ± 2.7 ; digestibilidad (D) = 58.0 ± 1.4 y valor biológico (VB) = 83. Como se desprende del valor de NPU señalado, el aprovechamiento de nitrógeno fue bajo.

Con miras a mejorar la digestibilidad, se sometió a prueba la acción de la papaína sobre el CP. El material así tratado fue sometido a nuevas experiencias biológicas y se obtuvo una D = 75.4 ± 1.05 , con lo que el nuevo valor de NPU (54.8 ± 1.1), mejoró ($P < 0.01$).

Manuscrito modificado recibido: 11-7-85.

- 1 Este trabajo fue financiado con fondos provenientes del subsidio No. 10234/82-Reg. SUBCYT, y de la Secretaría de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional de San Luis, República Argentina.
- 2 Directora del Proyecto No. 8002, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco y Pedernera (5700), San Luis, República Argentina.
- 3 Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la citada Universidad.

INTRODUCCION

El presente trabajo fue motivado por el interés que en la actualidad existe en torno al aprovechamiento de las proteínas de material vegetal verde, que en forma natural es aprovechado sólo por rumiantes. Numerosos autores (1, 2) han alertado sobre el valor de las proteínas foliares, ya que éstas tienen un perfil aminoacídico que las asemeja a las proteínas de origen animal.

Investigadores como Lugg (3), Smith y Agiza (4) y Betschart y Kinsella (5) señalan a estas proteínas como importantes fuentes de lisina, metionina y triptofano, lo que las hace especialmente adecuadas para complementos de otras proteínas vegetales.

La bibliografía sobre los métodos de extracción de proteínas a partir de hojas frescas es abundante (6-8).

Para nuestro estudio, se seleccionó como materia prima el género *Atriplex* de la familia de las Quenopodiáceas, arbustos que miden de 1 a 3 m de altura, con ramas gruesas que pueden alcanzar 4 a 5 cm de diámetro. El género *Atriplex* cuenta con 400 especies más o menos, de las cuales aproximadamente 30 se encuentran en la Argentina. En general son plantas muy plásticas, con gran capacidad de adaptación a las diversas condiciones ambientales de nuestro país.

De las distintas especies de *Atriplex*, elegimos la *numularia*, originaria de Australia, dado que posee grandes condiciones para ser introducida en nuestras zonas áridas. Ello se debe a que tiene gran resistencia a la sequía, siendo muy importante por el volumen de follaje rico en proteína bruta que es capaz de producir, pero su gran contenido en sales la hace poco agradable al paladar.

Silva y Pereira (9) estudiaron el efecto de solventes inorgánicos, pH y fuerza iónica en la obtención de concentrado proteínico (CP) de *A. numularia*. Estos mismos autores analizaron también la composición de las proteínas de hojas de *A. numularia* (10).

En consideración a lo dicho, juzgamos de interés obtener un CP de hojas frescas de plantas cultivadas en nuestra provincia; estudiar su valor nutricional, y su posible aprovechamiento en la alimentación de animales monogástricos.

MATERIALES Y METODOS

El material sometido a estudio se obtuvo a partir de almácigos realizados en el Centro Experimental "San Roque" de la Dirección de Agricultura de la Provincia de San Luis, en parcelas de 1 m x 10 m, los cuales fueron trasplantados a los 45 días a distancias de 1 m, lográndose arbustos de 1.50 m de altura. Se cortaron las hojas tiernas de plantas cuya edad oscilaba entre dos y medio y tres años, y se almacenaron en un congelador a la temperatura de -150°C hasta el momento de ser procesadas.

Seguidamente se hicieron determinaciones químicas porcentuales sobre el material fresco.

Los concentrados proteínicos se obtuvieron siguiendo, con algunas modificaciones, el método propuesto por Ostrowski-Meissner (11) para obtención de un CP apto para forraje. El método utilizado se esquematiza en la Figura 1.

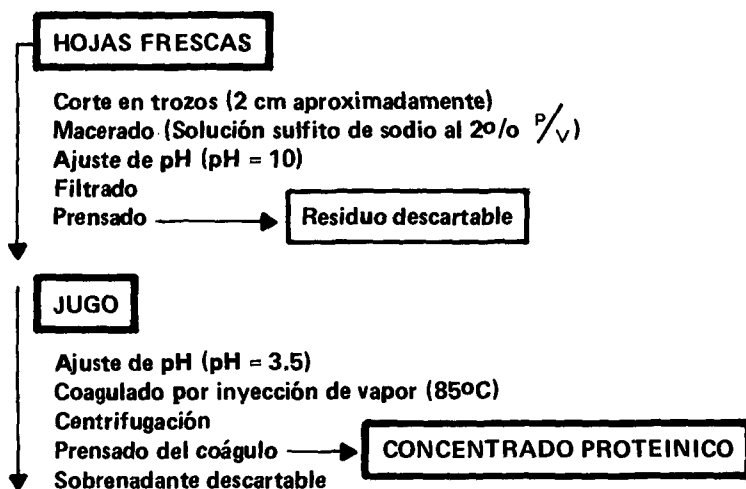


FIGURA 1

Diagrama de obtención de concentrado proteínico de hojas frescas de *A. numularia*

Después de varios estudios del pH y de la temperatura, se encontraron como óptimos: para extracción, un pH de 10 a temperatura ambiente, y para precipitación, el pH de 3.5 y la temperatura de 85°C.

El prensado final se lavó dos veces con HCl 0.05 N (una parte de precipitado a cuatro partes de solución ácida), dos veces con agua destilada, y dos en alcohol etílico de 96°C. El producto obtenido se secó a 40°C en ambiente de vacío. El CP acusó un color pardo verdoso, y este material fue sometido a un proceso de predigestión por acción de la papaína. Para dicha finalidad se usó una solución acuosa de la enzima, que contenía 0.75 mg/ml, la cual se agregó en la relación ml de solución/proteína = 10/100. Se incubó a 37°C durante 40 minutos, y se mantuvo un pH de 7. Transcurrido ese tiempo se evaporó a vacío a 40°C.

Métodos Analíticos

Se determinó el contenido de humedad, extracto etéreo, cenizas totales y fibra cruda de acuerdo a las técnicas descritas por la AOAC (12). Se valoraron azúcares reductores y no reductores (13), almidón (14), proteínas por mineralización mediante el procedimiento de Kjeldahl, con determinación posterior de nitrógeno usando electrodo de ión selectivo (15). Para convertir el dato de nitrógeno en proteína se usó el factor 6.25.

Se determinó, asimismo, el contenido de sodio y potasio por fotometría de llama, siguiendo los métodos de la AOAC (16) y usando, para el caso, un fotómetro de llama Metrolab Modelo R.C. 300. El sílice se estableció también de acuerdo a la AOAC (17), y el calcio y el fósforo se analizaron por las técnicas descritas en una comunicación anterior (18).

El contenido de aminoácidos se estableció en muestras desengrasadas

durante 6 hr con éter de petróleo y en caliente. La muestra fue hidrolizada con HCl 6N, en ampollas evacuadas y selladas a 110°C durante 22 horas, y la cuantificación final se hizo en un analizador de aminoácidos Beckman Modelo 112-CL. El triptofano se analizó utilizando la técnica informada por Lombard y Lange (19). Con los datos obtenidos se calculó el cómputo químico (CQ) para aminoácidos esenciales (20).

Evaluación de la Calidad de la Proteína Mediante Ensayos Biológicos

La utilización proteínica neta (NPU) y la digestibilidad verdadera se determinaron según las técnicas de Miller y Bender (21), empleándose ratas de la cepa Wistar de 30 días de edad, cuyo peso estaba comprendido entre 45 y 55 g. El experimento se llevó a cabo en grupos de cuatro animales cada uno: dos que recibieron la dieta bajo estudio y uno que se alimentó con la dieta apteica. Las dietas fueron preparadas de acuerdo a Sambucetti, Gallegos y Sanahuja (22), con un nivel proteínico de 100/o. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales, y se les suministró agua y dieta *ad libitum*.

RESULTADOS Y DISCUSION

Composición Porcentual de la Hoja de A. numularia

Los datos obtenidos se consignan en la Tabla 1, siendo de destacar el alto contenido de cenizas, potasio y silicio como dióxido (25.45, 2.95 y 1.69 g/100) respectivamente. La hoja es de poca palatabilidad, según pudimos comprobar en un experimento orientado a determinar la NPU, administrando una dieta (22) preparada con harina de hojas secas sin tratamiento. El registro de ingesta de alimento, llevado durante los 10 días de ensayo, mostró que ésta era muy baja (3.85–4.20 g/días), con bajos valores de NPU (23.00 ± 2.6).

En cuanto al contenido de proteína bruta, el valor obtenido por nosotros, en hoja fresca, fue de 4.69 g/100 g, superior al informado por Silva y Pereira, que es 3.3 g/100 g (10, 11).

Obtención y Estudio del Concentrado Proteínico

Empleando el método de extracción esquematizado en la Figura 1 obtuvimos un producto de tono verdoso con un contenido proteínico de 55.42 g/100 g. El rendimiento final, expresado como por ciento de nitrógeno obtenido como concentrado proteínico respecto al original en la hoja fresca, ascendió a $28.00 \pm 1.60/o$. En la Tabla 1 se incluyen también los valores de fibra cruda y cenizas totales, siendo de destacar el tenor elevado de estas últimas. Se analizó el contenido de aminoácidos, con los resultados que se detallan en la Tabla 2, que incluyen los valores de CQ para los aminoácidos esenciales, calculados en relación a la proteína del huevo. Los datos obtenidos revelaron que la proteína estudiada es de alto VB. Al comparar nuestros datos con los obtenidos por Silva y Pereira (10), vemos que éstos difieren fundamentalmente en lo que se refiere a la concentración de lisina y metionina, ya que los valores notificados por estos autores son de 5.5 y 1.9, respectivamente.

TABLA 1

COMPOSICION QUIMICA DE LAS HOJAS Y CONCENTRADO PROTEINICO

<i>En hojas frescas:</i>	
Agua	81.26 g/100 g
Nitrógeno	0.75 g/100 g
Proteína	4.69 g/100 g
<i>En materia seca:</i>	
Proteína	24.68 g/100 g
Extracto etéreo	6.90 g/100 g
Cenizas totales	25.45 g/100 g
Fibra cruda	9.22 g/100 g
Azúcares reductores (como maltosa)	1.92 g/100 g
Azúcares no reductores (como sacarosa)	0.21 g/100 g
Almidón	15.44 g/100 g
Sílice (como óxido de silicio)	1.60 g/100 g
Potasio	2.95 g/100 g
Sodio	440.00 mg/100 g
Fósforo	245.00 mg/100 g
Calcio	100.00 mg/100 g
<i>Concentrado proteínico:</i>	
Proteína	55.42 g/100 g
Fibra cruda	4.81 g/100 g
Cenizas totales	8.96 g/100 g
Humedad	4.53 g/100 g

Calidad Biológica de la Proteína

Con el CP sin tratamiento enzimático, se preparó la dieta (22), y los valores de NPU, digestibilidad y VB se consignan en la Tabla 3.

El valor de NPU obtenido fue de 48.30 ± 2.7 , valor que habla de un aprovechamiento bajo de nitrógeno. El valor de la digestibilidad es también bajo, 58.00 ± 1.4 . Estos resultados nos llevaron a predigerir el CP mediante la acción de la papaína; el material así obtenido se sometió a nuevas experiencias biológicas, obteniéndose el nuevo valor de digestibilidad con el material tratado, de 75.40 ± 1.05 , con lo que se consiguió mejorar la NPU (54.80 ± 1.12) en una significación de $P < 0.01$, calculado por la prueba "t" de Student. El VB calculado resultó ser de 73.

Si bien el aprovechamiento nitrogenado aumenta con el tratamiento enzimático, éste sigue siendo bajo. No hay concordancia entre la CQ y el VB experimental, lo que induce a sospechar que el método de obtención de la proteína podría disminuir la disponibilidad de algunos aminoácidos esenciales, disponibilidad que no fue determinada por nosotros por inconvenientes de carácter técnico.

En términos generales y en base a los resultados obtenidos, se puede concluir que la proteína de *A. numularia* es de calidad biológica

TABLA 2

CONTENIDO DE AMINOACIDOS DEL CONCENTRADO PROTEINICO DE
HOJAS DE *Atriplex numularia* Y VALORES DE COMPUTO QUIMICO

Aminoácidos	Proteína de huevo (g/16 g N)	Concentrado proteínico (g/16 g N)	Cómputo químico
Isoleucina	6.30	6.60	104
Leucina	8.80	10.64	120
Lisina	6.90	8.50	123
Metionina	3.10	3.00	96
Cistina + cisteína	2.40	1.80	75
Fenilalanina	5.70	6.42	112
Tirosina	4.20	5.50	130
Treonina	5.10	5.35	104
Triptofano	1.60	1.90	118
Valina	6.80	6.00	88
Arginina		6.75	
Alanina		5.44	
Acido aspártico		8.90	
Acido glutámico		12.04	
Glicina		5.23	
Prolina		4.90	
Serina		4.88	
Histidina		2.87	

TABLA 3

VALOR BIOLOGICO DEL CONCENTRADO PROTEINICO, SIN PREDIGERIR
Y PREDIGERIDO

Fuente de proteína en la dieta	NPU (x ± DE)	D (x ± DE)	VB (o/o)
Concentrado proteínico sin tratar	48.3 ± 2.7	58.0 ± 1.4	83
Concentrado proteínico tratado	54.8 ± 1.1	75.4 ± 1.05	73

aceptable, por lo que amerita ser objeto de más estudio. Esto atañe en particular a la extracción requerida para obtener un CP más puro, con menor contenido de fibra y sales. Lograr su aprovechamiento como complemento de las proteínas de cereales y leguminosas en un futuro próximo es precisamente el objetivo que persiguen estos estudios.

SUMMARY

BIOLOGICAL QUALITY OF THE LEAF PROTEIN ISOLATE OF
Atriplex numularia

Plant leaf proteins have acquired great relevance during the last two decades because of their well-balanced amino acid composition.

A study was therefore undertaken to evaluate the biological quality of the leaf protein of *Atriplex numularia*. The protein content of the fresh leaves from this plant was found to be 4.70 g/100, with a dry matter content of 18.70 g/100 g. A protein concentrate (PC) from the same material was then obtained by macerating the leaf in a 2% sodium sulfite solution at a pH of 10 and subjecting it to filtration and pressing. The product thus obtained had a dark greenish color and contained 55.42 g/100 g of protein.

The amino acid analysis revealed that its protein has a balance similar to that of animal origin proteins, with a lysine and methionine content of 8.5 g/16 g N and 3.0 g/16 g N, respectively. Biological assays were then carried out to evaluate nitrogen utilization, with the following resulting values: net protein utilization (NPU) = 48.3 ± 2.7; digestibility (D) = 58.0 ± 1.4, and biological value (BV) = 83. As inferred from the NPU value, nitrogen utilization was low.

Therefore, to improve digestibility values, the action of papain on the PC was assayed. The material thus treated was again submitted to biological trials, obtaining, this time a D of 75.4 ± 1.05, and thus, an improved new NPU value of 54.8 ± 1.1 ($p < 0.01$).

BIBLIOGRAFIA

1. Gerloff, E. D., I. H. Lima & M. A. Stahmann. Amino acid composition of leaf protein concentrates. *J. Agric. Food Chem.*, 13:139, 1965.
2. Akeson, W. R. & M. A. Stahmann. Nutritive value of leaf protein concentrate, an *in vitro* digestion study. *J. Agric. Food Chem.*, 13:145, 1965.
3. Lugg, J. W. H. Plant protein. *Adv. Protein Chem.*, 5:229, 1940.
4. Smith, A. M. & A. H. Agiza. The amino acids of several grass-land species, cereals and bracken. *J. Sci. Food Agric.*, 2:503, 1951.
5. Betschart, A. A. & J. E. Kinsella. Influence of storage composition on amino acid content and solubility of soybean leaf protein concentrate. *J. Agric. Food Chem.*, 22:116, 1974.
6. Cheeke, P. R., L. Telek, R. Carlsson & J. J. Evans. Nutritional evaluation of leaf protein concentrates prepared from selected tropical plants. *Nutr. Reps. Internat.*, 22:717, 1980.
7. Ostrowski-Meissner, H. T. & R. Carlsson. Isolation and purification of protein from green vegetable for direct human consumption. In: *Proc. 2nd Internat. Congr. Eng. Food, Helsinki, Finland, 1979*.
8. Lundborg, T. Fractionation by centrifugation of leaf proteins from *Brassica napus*, *Brassica olearacea*, *Helianthus annuus* and *Atriplex hortensis* as a function of pH and temperature. *Physiol. Plant.*, 48:251, 1980.
9. Silva E. & C. Pereira. Concentrados proteicos de hojas de *Atriplex numularia*. *Ciencia e Investigación Agraria*, 3:153, 1976.
10. Silva, E. & C. Pereira. Aislación y composición de las proteínas de hojas de *Atriplex numularia* y *Atriplex repanda*. *Ciencia e Investigación Agraria*, 3:169, 1976.

11. Ostrowski-Meissner, H. T. The isolation of protein concentrates from pasture herbage and their fractionation into feed-and food-grade products. *J. Food Proc. Pres.*, **3**:105, 1979.
12. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. 12th. ed. Washington, D. C., The Association, 1975.
13. Hart, F. L. & H. J. Fisher. *Análisis Moderno de los Alimentos*. Zaragoza (España), Ed. Acribia, 1971, p. 88.
14. Montes, A. L. *Bromatología*. Tomo II. Buenos Aires, Ed. Universitaria de Buenos Aires, 1969, p. 90.
15. Brenner, J. M. & M. A. Tabatabai. Use of an amoniac electrode for determination of amonium in Kjeldahl analysis of soils. *Comm. in Soil Sci. and Plant Anal.*, **3** (2):159, 1972.
16. Association of Official Agricultural Chemists. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. 13th ed. Washington, D. C. The Association, 1980, p. 871.
17. Association of Official Agricultural Chemists. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. 13th ed. Washington, D. C. The Association, 1980, p. 31.
18. Mucciarelli, S. I. L. de, J. A. Cid, M. M. Pedernera, M. A. Arellano & C. E. Guardia. Composición química y valor nutritivo de dos especies de *Prosopis* (*P. caldenia* y *P. torquata*). *Rev. Asoc. Bioq. Arg. (ABA)*, **46**:1, 1982.
19. Lombard, J. H. & D. J. de Lange. The chemical determination of tryptophan in food and mixed diets. *Anal. Biochem.*, **10**:260, 1965.
20. Mitchell, H. H. & R. J. Block. Some relationship between the amino acid contents of proteins and their nutritive values for rats. *Biol. Chem.*, **163**:599, 1949.
21. Miller, D. S. & A. E. Bender. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. *Brit. J. Nutr.*, **9**:382, 1955.
22. Sambucetti, M. E., G. Gallegos & J. C. Sanahuja. Estudio de la proteína extraída de semilla de lino. Valor nutritivo e inocuidad. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **23**:79, 1973.