

# INTRODUCCIÓN

El rápido crecimiento demográfico de la población mundial determina la necesidad de encontrar nuevas fuentes proteicas, que complementen a las ya existentes, para satisfacer la demanda de este nutrimento; en especial en países en vías de desarrollo, donde la escasez de proteínas de origen animal y su elevado costo conllevan a serios problemas de desnutrición. En este sentido se ha dirigido el interés hacia el aprovechamiento de las proteínas vegetales, procedentes tanto de fuentes convencionales como de no tradicionales en la alimentación humana, con la finalidad de incorporarlas en la elaboración de productos alimenticios.

Las características fisicoquímicas y las interacciones con otros componentes en el alimento, determinan el valor de una proteína dentro de un sistema alimenticio. Por consiguiente, para ser utilizadas en aplicaciones alimentarias las proteínas deben tener, en adición a su valor nutricional, ciertas propiedades funcionales que le confieran capacidad para suministrar textura, estabilidad física y otras condiciones deseables en el producto donde se incorporen (Yildirim *et al.*, 1996; Britten y Lavoie, 1992).

Varios estudios se han realizado sobre la obtención de concentrados y aislados proteicos de fuentes vegetales, así como también acerca de las propiedades funcionales de los mismos; lo cual ha conducido a un incremento sin precedentes en la producción y uso de esos materiales como ingredientes y en la fortificación de alimentos. Aunque la soya ha sido la materia prima más utilizada al respecto, oleaginosas como el cacahuete, el girasol y otras leguminosas como los frijoles comunes (*Phaseolus vulgaris*),

guisantes (*Pisum sativum*), habas (*Vicia faba*), también se han empleado con ese propósito en muchas preparaciones alimenticias. Con la finalidad de abaratar costos, de igual manera, se ha enfocado actualmente la atención al estudio de las proteínas de leguminosas silvestres, siendo algunas de las investigadas: las de Lupino, en dos de sus variedades, (*Lupinus albus* y *Lupinus mutabilis*) y las del frijol Tepary (*Phaseolus acutifolius*) (King *et al.*, 1985; Sathe *et al.*, 1982; Idouraine *et al.*, 1991).

El *Pithecellobium flexicaule* (Benth.), conocido comunmente como ébano, es una leguminosa silvestre que se distribuye en el noreste de la República Mexicana con alta productividad. Sus semillas son consumidas como complemento alimenticio por habitantes de la mencionada región. Estudios realizados por González-Quijada (1996), donde se evaluaron nutricionalmente semillas crudas y cocidas de esa leguminosa, determinaron que las mismas son de un alto contenido proteínico (35-37%, base húmeda), siendo su proteína de buena digestibilidad (79-95%), con una calidad similar a la de muchas leguminosas tradicionalmente comestibles.

Tomando como base el valor nutricional de la semilla de ébano, se considera importante estudiar sus proteínas a fin de caracterizarlas fisicoquímicamente para determinar las condiciones que permitan obtener un aislado proteico de esa leguminosa, así como la evaluación química, nutricional y funcional de dicho aislado. La necesidad de este tipo de información motiva la realización del presente estudio, cuyo propósito fundamental es aportar datos que permitan definir el potencial uso de las proteínas de la semilla de ébano como materia prima en la industria alimenticia.

# REVISIÓN DE LITERATURA

## 1.- CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS DE LEGUMINOSAS

### 1.1.- PERFIL DE PROTEÍNAS POR SOLUBILIDAD Y PUNTOS ISOELÉCTRICOS

La solubilidad de una proteína depende del tipo de aminoácidos que contenga, de tal manera que aquella que posea muchos residuos hidrófobos será menos soluble en agua que la constituida por un elevado número de grupos hidrofílicos (Baduí, 1993).

En años recientes la caracterización de las proteínas individuales de las semillas de leguminosas ha sido objeto de intensas investigaciones. Una de las técnicas más utilizadas para la separación de las diferentes fracciones proteicas de estas semillas se basa en el clásico procedimiento de Osborne (Chan y Phillips, 1994), según el cual las proteínas se fraccionan y clasifican de acuerdo a su solubilidad en diferentes solventes; designándolas como: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), glutelinas (solubles en álcalis diluidos) y prolaminas (solubles en alcohol). La proporción relativa de cada fracción en la semilla afecta, en mayor grado, a la calidad nutricional de la proteína total de la misma.

Las proteínas presentes en las distintas fracciones solubilizadas pueden ser aisladas por precipitación isoeléctrica.

El punto isoeléctrico se refiere al valor del pH donde, por lo general, las proteínas tienen su mínima solubilidad, debido a que a ese pH la carga eléctrica neta de los polímeros es cero y en ese caso las interacciones proteína-proteína se favorecen en mayor grado que las proteína-solvente, lo cual induce a que ocurra la máxima precipitación proteica.

Los puntos isoeléctricos de las proteínas vegetales muestran un amplio rango de variación, con valores que oscilan desde pH 0.5 a 8.2; dependiendo de la fuente proteica así como del solvente en el cual la proteína es extraída (Sumner *et al.*, 1981; Thanh y Shibasaki, 1976).

Sathe y Salunkhe (1981) señalan que las proteínas de las leguminosas son complejas en su naturaleza, siendo la mayoría de ellas globulinas y albúminas. En trabajos realizados por estos investigadores con frijoles comunes, variedad Gran Norteño (*Phaseolus vulgaris* L.), se determinó que las fracciones proteicas más abundantes en esas semillas son las globulinas (73.40%) y albúminas (21.18%), el pH isoeléctrico encontrado para las globulinas fue alrededor de 4.4. Santos *et al.* (1997) fraccionaron las proteínas de dos especies de la leguminosa *Lupinus* (*L. mutabilis* y *L. albus*), reportando que las proteínas más abundantes de esas leguminosas son las globulinas (43.0 y 31.7% para las dos especies respectivamente) seguidas de las albúminas (8.7 y 16.9%).

Sauvaire *et al.* (1984) caracterizaron las proteínas de la leguminosa silvestre fenogreco (*Trigonella foenum graecum* L.), determinando el perfil de proteínas de esas semillas, con los resultados siguientes: albúminas 73.4%, globulinas 10.9%, glutelinas 7.2% y un residuo de proteínas insolubles de 8.5%, no detectaron cantidades experimentalmente medibles de prolaminas.

De acuerdo con Boulter y Sosulski, citados por Sauvaire *et al.* (1984), las semillas de las leguminosas no contienen prolaminas o su porcentaje es muy bajo en comparación con el de las otras proteínas. Setti y Kulkarni (1993) fraccionaron las proteínas de la semilla de leucaena (*Leucaena leucocephala*) en base a sus solubilidades, determinando que las globulinas (43.5%) son las proteínas más abundantes en esas semillas, seguidas por las albúminas (28.4%), glutelinas (25.0%) y prolaminas (1.2%). Las proteínas en esas fracciones fueron cuantificadas después de la determinación de sus puntos isoeléctricos, los cuales variaron desde pH 2 a 2.5.

Petrucelli y Añón (1995) en estudios realizados para determinar los componentes del aislado proteico de soya (*Glycine max*) y sus interacciones, reportaron que las proteínas más abundantes en ese aislado fueron la globulina 11S (glicinina) y la globulina 7S ( $\beta$ -conglucina), en concentraciones del 34% y 27%, respectivamente, en relación al contenido total de proteínas.

## **1.2.- CUANTIFICACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEÍNAS**

El peso molecular de las proteínas es muy variable. Para cuantificarlo existen varias técnicas, siendo una de las más utilizada la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).

La SDS-PAGE es una técnica sensitiva para la caracterización de proteínas y la determinación de sus pesos moleculares, mediante ella se separan las proteínas de acuerdo a su masa cuando son colocadas sobre un gel de poliacrilamida y se les aplica un campo eléctrico (Sigma Chemical Company, 1984).

El SDS (dodecil sulfato sódico) es un detergente aniónico que despliega a las proteínas, uniéndose a ellas de forma estequiométrica, dando a cada proteína una relación carga/masa aproximadamente igual en todas ellas. En esta técnica se añade también  $\beta$ -mercaptoetanol (tanto al gel de poliacrilamida como a la mezcla de proteínas) para romper enlaces disulfuros intra e inter moleculares, de modo que se despliegan totalmente las proteínas y se separan las diferentes subunidades. Por acción de un campo eléctrico aplicado al gel cargado con la mezcla de proteínas, estas se separan, migrando en relación inversa a su masa molecular (Freifelder, 1982).

Qi *et al.*, (1997) realizaron la caracterización electroforética de un aislado proteico de soya, determinando que estaba principalmente

compuesto de lipoxigenasa (94 kDa),  $\beta$ -amilasa (60 kDa), tres subunidades de  $\beta$ -conglucina (80, 76 y 50 kDa) y de varias subunidades ácidas y básicas de glicina (11S globulina) con pesos moleculares en el rango de 18-38 kDa. Henn y Netto (1998) efectuaron la caracterización bioquímica y la hidrólisis enzimática de diferentes aislados proteicos (comerciales) de soya, reportando que en todos ellos las principales proteínas son las globulinas 7S ( $\beta$ -conglucina) compuesta de las subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  y la globulina 11S (glicina) compuesta de varios polipéptidos ácidos y básicos.

Santos *et al.*, (1997) determinaron el patrón electroforético de las fracciones albumínicas y globulínicas de dos especies de *Lupinus*, observando que estos patrones eran considerablemente diferentes en las dos especies de leguminosas estudiadas (*L. mutabilis* y *L. albus*). En la fracción albumínica de la especie *Lupinus mutabilis* detectaron la presencia, abundante, de una proteína con peso molecular de 34 kDa, así como también proteínas con altos pesos moleculares en las globulinas de la mencionada especie.

En la caracterización electroforética (SDS-PAGE) de las proteínas de frijoles Gran Norteño (*Phaseolus vulgaris* L.), realizada por Sathe y Salunkhe (1981), se determinaron la presencia de 14 y 10 subunidades proteicas en las fracciones de albúminas y globulinas respectivamente, con pesos moleculares de 266,000 y 123,000 Daltons, en el mismo orden respectivo. Chen *et al.*, (1984) caracterizaron electroforéticamente las proteínas de semillas de frijoles adzuki (*Vigna angularis*), reportando la existencia de dos subunidades en la globulina 7S ( $\alpha$  y  $\beta_1$ ) con pesos moleculares de 55,000 y 35,000 Daltons respectivamente.

Chan y Phillips (1994) al estudiar las proteínas de semillas de guisante (*Vigna unguiculata* L.) encontraron la presencia de cuatro polipéptidos principales en la fracción globulínica con masas moleculares de 65,60, 59 y 50 kDa., cuatro en las albúminas con pesos moleculares de 99, 91, 32 y 30 kDa. En tanto que en las fracciones de glutelinas y prolaminas encontraron polipéptidos con masas moleculares en el rango de 44-62 y 54-105 kDa, respectivamente.

## 2.- AISLADOS PROTEICOS DE LEGUMINOSAS

Los aislados proteicos son la forma comercial más purificada de proteínas, puesto que contienen 90% o más de este nutriente. Los de leguminosas se obtienen al eliminar los polisacáridos, oligosacáridos y otros componentes indeseables de las semillas de estos vegetales (Huesa, 1983).

El proceso de aislamiento se basa en las diferencias de solubilidades y en el punto isoeléctrico de las distintas fracciones proteicas que componen a la semilla. Para la obtención de los aislados se parte de harinas desgrasadas que hayan recibido un tratamiento térmico mínimo, efectuándose la extracción de las proteínas, por lo general, con agua o álcalis a un valor de pH que depende de la solubilidad de las proteínas que serán aisladas (por lo común mayor de 7.5); los polisacáridos y otras sustancias contenidas en el residuo insoluble se separan por centrifugación. Basándose en el punto



isoelectrico de las fracciones proteicas de las semillas, se ajusta el pH del extracto a un determinado valor a fin de que precipiten la mayor cantidad posible de sus proteínas.

Aislados y concentrados proteicos provenientes de fuentes vegetales juegan un papel importante en muchas formulaciones de nuevos productos alimenticios. La aceptabilidad de tales preparaciones proteicas depende de su calidad sensorial, valor nutricional y de sus propiedades funcionales, todas las cuales son afectadas por el método de obtención (Naczki *et al.*, 1986).

Qi *et al.* (1997) obtuvieron un aislado proteico de soya, partiendo de la harina desgrasada con hexano (en relación 1:2 harina-solvente) por agitación mecánica a temperatura ambiente durante 10 minutos, efectuando la extracción de proteínas con agua desionizada ajustada a pH 9.0 y subsecuentemente precipitándolas a pH isoelectrico de 4.5; el aislado obtenido contenía alrededor de 92% de proteínas.

El rendimiento del aislado proteico está en función de la extracción de proteínas de la semilla y de las condiciones de la precipitación isoelectrica. A fin de lograr el mayor rendimiento posible en la obtención del aislado se debe procurar que la extracción de proteínas sea máxima. Son varias las condiciones que influyen sobre la extracción proteica: pH, temperatura, tiempo de extracción, relación harina-extractante, efectos de sales, etc. Bello y Okezie (1989) investigaron el efecto del pH (2, 4, 6, 8, 10 y 12), temperatura (15°, 30° y 45°C), relación harina-solvente (1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:50), tiempo de extracción (10, 20 y 30 minutos) y tipo y concentración de sal (NaCl y CaCl<sub>2</sub>, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 1.0 M) en la

extracción de proteínas de harinas desgrasadas de semillas maduras de frijoles alados (*Psophocarpus tetragonolobus* L.); reportando que la extractibilidad de proteínas es altamente dependiente del pH (más que de las otras variables). La máxima extracción proteica fue obtenida a pH 12 a 45°C con un tiempo de extracción de 30 minutos y la mínima a pH 4, 15°C y 10 minutos. También refieren que las diferentes combinaciones de tiempo y temperatura ensayada no afectaron significativamente a la extracción de proteínas. En cuanto a la relación harina-extractante encontraron que al incrementarse ésta, aumenta la cantidad de proteína extraída; sin embargo señalan que al utilizar la relación 1:30 (w/v) el aumento fue solo del 5% respecto a la 1:20 (w/v) por lo cual indican que tan pequeño incremento no justifica el uso de grandes cantidades de solvente en vista del potencial problema para manipular el volumen de los extractos. Por esta razón recomiendan efectuar la extracción con una relación 1:20 (w/v). La extracción de proteínas fue más alta con la solución de NaCl que con la de CaCl<sub>2</sub>, observando un decrecimiento al utilizar concentraciones de NaCl entre 0.3 y 1.0 M.

King *et al.* (1985) obtuvieron aislados proteicos de harina desgrasada de la leguminosa lupino (*Lupinus albus* cv Multolupa), efectuando la extracción de proteína a pH 8.6 y precipitándola a tres pH isoelectricos: 5.1, 4.2 y 4.9. El contenido proteico de los aislados, después de lavados con agua ajustada al pH de precipitación y liofilizados, fue de alrededor de 95%. Del total de proteína extraída (a pH 8.6), el 79.5% precipitó a pH 4.9 y el 80.3% a pH 5.1 y pH 4.2. En cuanto al rendimiento, el aislado proteico a pH 4.9 correspondió al 25.2% del material de partida, en tanto que a pH 4.2 y 5.1 fue del 25.5%.

Paredes-López *et al.* (1991) aislaron proteínas del garbanzo (*Cicer arietinum*), extrayéndolas de harinas desgrasadas de esa leguminosa con agua ajustada a pH 8.5 y precipitándolas isoelectricamente a pH 4.5. El aislado después de lavado con agua ajustada a pH isoelectrico y liofilizado mostró un contenido proteico de 84.8%, en base seca.

### 3.- PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS DE LEGUMINOSAS

Además de su importancia como fuente de aminoácidos en la nutrición, las proteínas influyen de manera determinante en las características reológicas (elasticidad, cohesión, viscosidad, gelificación, etc.) y de textura de los alimentos (Cherry, 1981). Por estas cualidades, las proteínas se usan comercialmente en la fabricación de productos alimenticios a los cuales confieren sus propiedades físicas y químicas.

De manera general, las propiedades funcionales se definen como "cualquier propiedad fisicoquímica de los polímeros que afecta y modifica alguna característica de un alimento y que contribuye a la calidad final del producto" (Kinsella, 1976). Así, por ejemplo, son propiedades funcionales: La absorción de agua y grasa, la emulsificación, gelificación, la formación de espuma, la solubilidad, etc. Estas dependen de factores intrínsecos propios de la molécula de proteína, como por ejemplo: La secuencia de

aminoácidos, peso molecular, carga eléctrica, solubilidad, conformación, hidrofobicidad, etc.; así como también de factores extrínsecos del medio que las rodea como: pH, fuerza iónica, temperatura, constante dieléctrica, etc. (Badui, 1993).

Las propiedades funcionales permiten predecir el comportamiento de los ingredientes proteicos dentro de un producto alimenticio, lo cual determinará su campo de aplicación en la industria de alimentos.

Entre las leguminosas, la soya ha sido la más utilizada a nivel industrial debido a las propiedades funcionales que exhiben sus proteínas que la hacen apta para incorporarla en la elaboración de diversos alimentos. Por ejemplo, por su capacidad emulsificante, gelificante y de absorción de grasa es empleada en la industria cárnica para la elaboración de embutidos; por su capacidad de absorción de agua, en la confección de pastas y derivados; por su capacidad espumante se usa como sustituto de la clara de huevo en la industria de helados y confitería, etc. No obstante, en los años recientes se han realizado numerosas investigaciones relacionadas con las propiedades funcionales de las proteínas de semillas de otras leguminosas y actualmente muchas de ellas son también utilizadas en la preparación de varios productos alimenticios (Tjahjadi *et al.*, 1988).

Las propiedades de las proteínas inherentes a su funcionalidad no solo están determinadas por su origen, sino también por las condiciones del procesamiento utilizado para extraerlas de sus fuentes naturales. Algunas veces estas condiciones juegan un papel determinante, por lo cual no es posible hacer una regla general sobre las características funcionales de un

cierto tipo de proteínas. Por lo general, las propiedades funcionales las presentan las proteínas, en mayor grado, en su estado natural normal; perdiéndose éstas, en gran medida, cuando ocurre la desnaturalización (Chan, 1983).

Cada propiedad funcional de las proteínas requiere de características diferentes. Por ejemplo, para la eficiente formación de espuma es importante la existencia de moléculas flexibles en la proteína, con pocas estructuras secundarias y terciarias; mientras que en la estabilidad de la espuma desempeña un papel primordial la elasticidad y cohesión molecular (Yıldırım *et al.*, 1996). Por otra parte, muchas de las propiedades funcionales están interrelacionadas, por eso, algunas veces, al modificarse una de ellas se producen cambios en el comportamiento de otras.

## **SOLUBILIDAD:**

La solubilidad en agua de los materiales proteicos es de gran importancia en Tecnología de los Alimentos. Aunque por sí misma esta propiedad sólo tiene aplicación directa en la elaboración de bebidas y productos similares; sin embargo, debe siempre ser determinada puesto que incide sobre otras propiedades como, por ejemplo, la emulsificación, gelificación, formación de espuma, etc. Por eso ha sido usada como una medida para otras propiedades funcionales y su valoración da una información ponderable sobre la proteína como ingrediente.

La solubilización es el resultado del balance entre fuerzas subyacentes proteína-proteína e interacciones proteína-solvente; lo cual implica que se establezca una fuerte interacción proteína-solvente para que el material proteico se solubilice en alto grado, de lo contrario se favorecerá la asociación proteína-proteína que disminuye la solubilidad e incluso puede provocar la precipitación. Este balance es afectado por cambios en el pH del medio, en la concentración, temperatura, naturaleza del solvente, presencia de otros componentes, etc. (Hermansson, 1979).

El pH del medio donde está inmersa la proteína influye marcadamente en su solubilidad. Para la mayoría de las proteínas la solubilidad es mínima a valores de pH correspondientes a su punto isoeléctrico y aumenta al alejarse de él. Esto se debe a que en el punto isoeléctrico se igualan las cargas eléctricas positivas y negativas de los polímeros, lo cual favorece la interacción proteína-proteína que induce a la agregación, disminuyendo por consiguiente la solubilidad.

Las proteínas de las leguminosas contienen más aminoácidos ácidos que básicos (como la mayoría de las proteínas), por eso sus puntos isoeléctricos se encuentran, por lo general, en el rango de pH ácido (pH menor que 7), siendo, en consecuencia, su solubilidad mayor en el lado alcalino.

Al igual que las demás propiedades funcionales, la solubilidad de las proteínas está influenciada, en gran medida, por las condiciones del procesamiento; por esta razón para un mismo material proteico se reportan en la literatura valores diferentes de su solubilidad. Chen y Morr (1985)

determinaron la solubilidad de tres aislados proteicos de soya, dos obtenidos en el laboratorio (uno como control y otro reducido en su contenido de fitatos) y un tercero de origen comercial, realizando el ensayo a pH 3, 6 y 9; las solubilidades reportadas a pH 6 para el aislado control, el reducido en fitatos y el comercial fueron 22.3, 11.6 y 12.1%, respectivamente.

Solsulsky y Mc Curdy (1987) obtuvieron el perfil de solubilidad de aislados proteicos de soya (*Glicine max*), chicharos (*Vigna unguiculata* L.) y habas (*Vicia faba*) en el rango de pH de 2 a 11. A pH 2 la solubilidad de los tres aislados estudiados fue de alrededor del 30% para el de soya, 60% para el de chicharos y 60% para el de habas; estas solubilidades decrecieron progresivamente en los tres perfiles, alcanzando valores mínimos en el intervalo de pH 4-5 (correspondiente a los puntos isoeléctricos de los tres materiales proteicos ensayados) para luego experimentar un aumento progresivo, al incrementarse el pH, hasta valores de más del 90% a pH 11. En el rango de pH 6.5-7.0 las solubilidades fueron de 30.6, 38.1 y 40.0% para los aislados proteicos de soya, chicharos y habas, respectivamente. Paredes-López *et al.* (1991) realizaron la caracterización nutricional y funcional de aislados proteicos obtenidos de garbanzo (*Cicer arietinum*) por micelización y precipitación isoeléctrica, determinando que a pH 7.0 las solubilidades de estos aislados fueron de 72.5 y 60.4% respectivamente, siendo superiores a la encontrada para el aislado de soya utilizado como referencia comparativa (21.2%).

En la elaboración de una gran variedad de productos alimenticios se utiliza la sal como ingrediente, por ello es importante considerar los efectos salinos en la caracterización funcional de una preparación proteica.

Hermansson (1979) refiere que el efecto salino es dependiente del pH. Así, al exponer los resultados del estudio de la solubilidad de un aislado de soya en función de la concentración de NaCl a pH 3.0, 5.0 y 7.0; muestra que a pH 3.0 la solubilidad del aislado decrece progresivamente con el aumento de la fuerza iónica, sin embargo, a pH 5.0 se observa que incrementa consecutivamente al incrementarse la concentración salina, mientras que a pH 7.0 disminuye hasta una concentración de NaCl 0.2 M para luego aumentar levemente hasta que la concentración de NaCl es 1.0 M. De estos resultados se infiere que no hay un patrón de comportamiento predecible para la solubilidad del aislado de soya en función del efecto salino.

Varias investigaciones se han realizado para estudiar el efecto del tratamiento térmico, bajo diferentes condiciones (temperatura, tiempo, concentración proteica, pH, fuerza iónica), sobre las propiedades funcionales (Hermansson, 1979; Kinsella, 1976; Petrucelli y Añón, 1994; Sorgentini *et al.*, 1995). Petrucelli y Añón (1994), con el propósito de establecer las relaciones entre diferentes tratamientos y las modificaciones estructurales y funcionales de aislados proteicos de soya, obtenidos en el laboratorio, sometieron a dichos aislados a calentamiento a distintas temperaturas y tiempos, reportando que el tratamiento térmico a 98°C durante 30 minutos produjo una disminución importante en la solubilidad de los aislados. Sin embargo, los tratados a 80°C y 92°C durante corto tiempo (6 minutos) no sufrieron cambios significativos en su solubilidad.



## ABSORCIÓN DE AGUA Y GRASA

La absorción de agua y grasa son propiedades funcionales básicas de los componentes proteicos los cuales determinan la calidad (textura, apariencia, retención de sabor) y rendimiento de productos cárnicos terminados, así como de muchas otras preparaciones alimenticias (Vani y Zayas, 1995).

Las interacciones proteína-agua se efectúan por medio de los aminoácidos polares de naturaleza catiónica, aniónica o no iónica, y cada uno de ellos tiene diferente capacidad de retención de agua, siendo mayor ésta cuando el aminoácido se encuentra en forma ionizada; razón por la cual la absorción de agua está influenciada por el pH del medio (Badui, 1993). Esto implica que las estructuras secundarias y terciarias juegan un papel importante en la capacidad de absorción de agua de una proteína, debido a que los grupos hidrófilos deben estar expuestos al exterior en contacto con el agua para que sea efectiva la interacción.

Tjahjadi *et al.*, citados por Paredes-López *et al.* (1991) mencionan que la capacidad de absorción de agua de los aislados proteicos puede ser afectada por factores conformacionales y del medio ambiente o del entorno donde este el aislado; cambios conformacionales en las moléculas de proteínas pueden exponer los aminoácidos internos en la estructura, haciendo que puedan interaccionar con el agua. Diferencias en el contenido de carbohidratos podrían también afectar la absorción de agua. Por otra parte, factores extrínsecos como el pH y la temperatura influyen

marcadamente en la capacidad de absorción de agua de los materiales proteicos. Vani y Zayas (1995) determinaron el efecto del pH y la temperatura sobre la capacidad de absorción de agua de proteínas del germen de Trigo, ajustando el pH de la suspensión proteína-agua a valores comprendidos entre 4.0 y 8.0 e incubándolas a temperaturas de 5°, 15°, 30° y 70°C por 30 minutos, reportando que la absorción de agua fue más alta a pH 8.0 y 70°C y más baja a pH 4.0 y 5°C. Sosulski y Mc Curdy (1987) evaluaron las capacidades de absorción de agua y grasa de aislados proteicos de soya, chicharos y habas a 21° y 70°C, los valores determinados para la absorción de agua de los tres aislados, en el mismo orden respectivo, fueron: 2.65, 2.52 y 2.16 g H<sub>2</sub>O/g muestra a 21°C y 3.71, 2.97 y 2.34 g H<sub>2</sub>O/g muestra a 70°C, lo cual evidencia que la desnaturalización proteica, por efectos del calor, aumentó la cantidad de agua absorbida por las proteínas de las leguminosas estudiadas. Con respecto a la absorción de grasa, los resultados obtenidos fueron 1.03, 0.98 y 1.78 g aceite/g muestra, a 21°C, para los aislados de soya, chicharo y habas, respectivamente; a 70°C no hubo cambios significativos en la capacidad de absorción de grasa de los tres aislados.

La capacidad de absorción de grasa de las proteínas es una importante propiedad funcional de estos polímeros debido a que aumenta o mejora la retención del sabor y el gusto de muchos productos alimenticios donde son usados como ingredientes (Paredes-López *et al.*, 1991). Swamylingappa y Srinivas (1994) al investigar las propiedades funcionales de aislados proteicos de soya obtenidos de harinas de esa leguminosa, tratadas y no tratadas con ácido acético, encontraron para el aislado de soya procedente de la harina no tratada con ácido, una capacidad de absorción de grasa con un

valor de 190 ml aceite/100 g proteína. Los mismos autores mencionan que el mecanismo de absorción de aceite no está entendido claramente, aunque se conoce que los parámetros como: tamaño de las macromoléculas, área superficial, la carga eléctrica y la hidrofobicidad afectan la absorción de aceite. Sathe y Salunkhe (1981), determinaron las capacidades de absorción de agua y grasa de aislados proteicos de frijoles Gran Norteño (*Phaseolus vulgaris* L.), reportando valores de 2.73 g H<sub>2</sub>O/g muestra y 1.57 g aceite/g muestra, respectivamente.

La fuerza iónica del medio donde es extraído el aislado proteico también influye en sus capacidades de absorción de agua y grasa, Liadakis *et al.* (1998) aislaron proteínas de semillas de tomate con soluciones salinas, observando que los aislados proteicos extraídos con solución de NaCl mostraron capacidades de absorción de agua y grasa más altas que los extraídos con agua.

## EMULSIFICACIÓN

La capacidad emulsificante y la estabilidad de la emulsión son parámetros usados corrientemente en la caracterización funcional de las proteínas. Hermansson (1979), establece claramente la diferencia entre estos dos términos, así, menciona que: "La capacidad emulsificante denota la cantidad máxima de aceite que puede ser emulsificada por una dispersión de proteína; mientras que la estabilidad de la emulsión se refiere a la capacidad de una emulsión, con una cierta composición, para permanecer sin cambios".

Las proteínas pueden actuar como emulsificadores porque reducen la tensión interfacial entre el agua y el aceite, formando películas firmes en la interfase lo cual evita la unión de las partículas de aceite (Kanterewicz *et al.*, 1987). Para que esto ocurra las moléculas de proteína deben migrar hacia la interfase agua-aceite y reorientarse (previo desdoblamiento) de tal manera que sus aminoácidos apolares estén dirigidos hacia la fase lipídica y los polares hacia la fase acuosa. De lo anterior se infiere que el balance de aminoácidos hidrófobos e hidrófilos de una proteína es determinante en su propiedad emulsificadora. Si en la proteína predominan los sitios hidrófilos, ésta tenderá a solubilizarse en agua y su acción en la interfase sería casi nula.

La capacidad de una proteína para actuar como un agente emulsificante depende tanto de su rapidez de migración a la interfase agua-aceite, como de su capacidad para formar una película estable. Mientras más estructurada esté la proteína, más rígida y cohesiva será la película formada, la cual debe actuar como una barrera electrostática, estructural y mecánica (Petrucci y Añón, 1994).

La naturaleza de la proteína influye en su actividad emulsificante. A causa del tamaño de las moléculas, las proteínas globulares difunden relativamente lentas hacia la interfase, lo cual resulta en un decrecimiento de la capacidad emulsificante del material proteico (Sathe *et al.*, 1982).

En la industria alimenticia tienen gran aplicación las proteínas por sus propiedades emulsificadoras, puesto que se utilizan para estabilizar alimentos con estructura de emulsión como, por ejemplo, los embutidos, mayonesas, cremas, helados, productos de repostería, etc. Por su alta

capacidad emulsificante las proteínas de la soya son una de las más empleadas en este aspecto. Sosulski y McCurdy (1987) determinaron que las capacidades emulsificantes de los aislados de soya, chícharos y habas son 451, 366 y 386 ml aceite/g muestra, respectivamente. Al evaluar las propiedades funcionales de las fracciones albumínicas y globulínicas del frijol Tepary (*Phaseolus acutifolius*), comparándolas con las del aislado proteico de soya, Idouraine *et al.* (1991) reportaron para los tres materiales proteicos, en el mismo orden respectivo, valores de 315, 270 y 312 ml aceite/g proteína. Sathe y Salunkhe (1981) al determinar la capacidad emulsificante de albúminas, globulinas y aislado proteico de frijoles Gran Norteño encontraron valores de 63.8, 44.0 y 63.8 g aceite/ g muestra, respectivamente.

La capacidad emulsificante de los materiales proteicos decrece al aumentar la concentración de la proteína. Investigaciones realizadas por Stahe *et al.* (1982 a,b) en concentrados proteicos de semillas de la leguminosa Lupinus (*Lupinus mutabilis*) y de frijoles alados (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) mostraron que al aumentar la concentración proteica desde el 2 al 10% en ambas preparaciones, la capacidad emulsificante decreció desde 88.9 hasta 56.9 g aceite/g muestra para el primero y desde 222.2 hasta 53.3 g aceite/g muestra para el segundo. La misma tendencia fue observada por King *et al.* (1985) al evaluar la capacidad emulsificante de aislados proteicos de otra variedad de Lupinus (*Lupinus albus*).

La capacidad emulsionante es también dependiente del pH del medio. Sathe *et al.* (1982) evaluaron la capacidad emulsificadora de un concentrado proteico de frijoles alados en el rango de pH de 2 a 10, reportando que ésta

disminuyó desde 200.0 g aceite/g muestra a pH 2 hasta 93.3 g aceite/ g muestra a pH 4 (cerca del punto isoeléctrico de las proteínas de esos frijoles), para luego aumentar progresivamente hasta 311.1 g aceite/g muestra a pH 10, atribuyendo este comportamiento a la influencia de la solubilidad proteica en la capacidad emulsificante. Similar tendencia fue observada por Tjahjadi *et al.* (1988) en la capacidad emulsificadora de un aislado proteico obtenido de frijoles adzuki (*Vigna angularis* cv Takara), y por King *et al.* (1985) en un aislado proteico de Lupinus (*Lupinus albus*).

El efecto salino es otro factor que modifica la capacidad de emulsificación de los preparados proteicos. King *et al.* (1985) determinaron el efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad emulsificadora de aislados proteicos de Lupinus obtenidos por precipitación isoeléctrica a pH 4.2, 4.9 y 5.1; para los tres aislados estudiados la capacidad emulsificante aumentó al incrementarse la concentración de NaCl desde 0 hasta 0.4 M, para luego decrecer con el aumento de la concentración de la sal hasta 1.0 M. Tendencias similares fueron reportadas por Abbey e Ibeh (1987, 1988) en la capacidad emulsionante de las harinas de frijoles Marrones (*Canavalia rosea* DC) y de chícharos (*Vigna unguiculata* W) y por Liu y Hung (1998) en concentrados proteicos de garbanzos (*Cicer arietinum*).

## **FORMACIÓN DE ESPUMAS**

Las espumas son sistemas bifásicos en los cuales las burbujas de gas (por lo general aire) están rodeadas por una fase líquida continua, formando

películas delgadas. La capacidad de las proteínas para formar espumas depende de su facilidad para migrar hacia la interfase aire-agua y formar una película interfacial cohesiva que sea capaz de atrapar y retener el aire. Esta película debe ser lo bastante fuerte para retener humedad y soportar esfuerzos mecánicos (Phillips *et al.*, 1990).

La capacidad espumante está relacionada con la rapidez de decrecimiento de la tensión interfacial aire-agua causada por la adsorción de moléculas de proteína, las cuales se orientan con sus grupos hidrófilos hacia el exterior de las burbujas, en contacto con el agua, y con los hidrófobos hacia el interior, contactando con el aire. Graham y Phillips, citados por Sathe *et al.* (1982), observaron que moléculas flexibles de proteínas, tales como  $\beta$ -caseína, reducen rápidamente la tensión interfacial, teniendo en consecuencia una buena capacidad espumante; mientras que moléculas de proteínas globulares altamente ordenadas, como la lisozima, son difíciles de desnaturalizarse en la superficie, dando una baja espumabilidad. Sin embargo, la baja capacidad espumante no puede ser relacionada con todas las proteínas globulares. Susheelamma y Rao, citados por los autores antes nombrados, reportaron excelentes capacidades espumantes de proteínas globulares de frijoles negros (*Phaseolus mungo*).

La formación de espuma es una propiedad funcional de las proteínas utilizada en la elaboración de diversos productos de panificación, repostería y confitería, así como también en la preparación de postres y alimentos congelados. Desde el punto de vista de su aplicación en Tecnología de Alimentos se requiere no solamente que la proteína sea capaz de formar un volumen grande de espuma, sino que ésta sea estable, es decir que no tienda

a colapsar en corto tiempo. Yildirim *et al.* (1996) refieren que el aislado proteico de soya y el del suero de la leche tienen buenas capacidades espumantes, sin embargo, las aplicaciones prácticas de las espumas de estas proteínas son limitadas debido a su relativa inestabilidad. Al contrario, la espuma formada por las proteínas de la clara del huevo son de una alta estabilidad; razón por la cual, además de su amplio uso a nivel industrial, también son empleadas como estándar de referencia para comparar la estabilidad de las espumas de otras proteínas.

Sosulski y McCurdy (1987) determinaron la capacidad espumante y la estabilidad de la espuma de aislados proteicos de soya, chicharos y habas, reportando como volumen inicial de la espuma formada por cada aislado: 120, 315 y 200 ml, respectivamente. En cuanto a la estabilidad, ésta fue medida en el intervalo de tiempo de 2 horas, al cabo del cual había colapsado el 34, 45 y 70% del volumen inicial de la espuma para los tres aislados estudiados, en el mismo orden respectivo.

Idouraine *et al.* (1991) evaluaron la capacidad espumante y, subsecuentemente, la estabilidad de la espuma de albúminas y globulinas del frijol Tepary, así como también las de un aislado proteico de soya usado como referencia, determinando que la capacidad espumante de las albúminas, globulinas y del aislado de soya fueron, respectivamente, 586, 150 y 237% (en relación al incremento de volumen); con estabilidades de la espuma del orden de 32, 6 y 14%.

La capacidad espumante es dependiente de la concentración de proteína. Britten y Lavoie (1992) investigaron como afectaba la



concentración proteica a las propiedades espumantes del caseinato de sodio, de un aislado proteico del suero de leche y de la ovalbúmina; ensayando concentraciones de proteína en el rango de 0.2-20.0%, encontraron que para los tres materiales proteicos la expansión de la espuma se incrementaba con la concentración hasta un valor límite (alrededor del 10%) a partir del cual decrecía. Sathe *et al.* (1982 a,b) reportaron un aumento de la capacidad espumante al incrementarse la concentración de proteína en concentrados proteicos de semillas de lupino y de frijoles alados. Estos autores también observaron que la capacidad espumante de los concentrados proteicos estudiados se incrementaba por la adición de sal (NaCl). Respecto a la influencia del pH sobre las propiedades espumantes de las proteínas, los mismos investigadores determinaron que, en el rango de pH 2-12, la máxima capacidad espumante del concentrado proteico de Lupino fue observada a pH 2 y la mínima en la región isoelectrica (pH 4.0). Sin embargo, la máxima estabilidad de la espuma fue encontrada a pH 4.0, decreciendo progresivamente a pH alcalinos. Similar tendencia fue reportada para el concentrado proteico de frijoles alados y también por Abbey e Ibeh (1988) en la harina de chicharos.

## **FORMACIÓN DE GELES**

Una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas es su capacidad para formar geles después del calentamiento. La gelificación determina muchos parámetros reológicos en los productos alimenticios sólidos o semisólidos porque contribuye a la textura, apariencia y actúa

como una matriz rígida que retiene no solamente agua sino también lípidos, proteínas disueltas, carbohidratos y otras especies (Ker y Toledo, 1992).

Los geles en los alimentos son inducidos, por lo general, por tratamiento térmico de la suspensión, seguido de un rápido enfriamiento, aunque también pueden formarse por acción enzimática o por adición de iones divalentes.

El mecanismo de la gelificación es complejo y comprende un paso previo en el cual se desdoblán las proteínas, para luego ocurrir la interacción proteína-proteína que da origen a la estructura tridimensional ordenada característica del gel (Badui, 1993). La dureza del gel depende de la intensidad de las fuerzas que constituyen dicha estructura (uniones hidrófobas, hidrófilas y covalentes) y éstas, son dependientes del pH, de la concentración de la proteína, de la temperatura, de la fuerza iónica, del grado de desnaturalización proteica, etc. (Gossett *et al.*, 1984; Hillier *et al.*, 1980).

Para medir la capacidad gelificante de los materiales proteicos se han propuesto varias metodologías, siendo una de la más usada la establecida por Coffman y García (1977), modificada por Sathe y Salunkhe (1981 b), la cual se fundamenta en la determinación de la mínima concentración a la que gelifica una suspensión del material proteico en agua después de haber sido calentada y enfriada. De acuerdo a esto, mientras menor sea dicha concentración mayor será la capacidad gelificante del material. Sathe y Salunkhe (1981 b) determinaron la capacidad de formación de geles de la harina, de las albúminas, de un concentrado y de un aislado proteico de frijoles Gran Norteño, reportando que la menor concentración de

gelificación fue de 10, 18, 8 y 12% (w/v) respectivamente. Las globulinas no formaron geles firmes en el rango de concentración ensayada, 2-20% (w/v); por lo cual ellos mencionan que la gelificación no solamente es función de la cantidad de proteína, sino también del tipo de proteína y de los componentes no proteicos. King *et al.* (1985) evaluaron la capacidad de gelificación de dos aislados proteicos de la leguminosa *Lupinus*, uno de ellos neutralizado (pH 4.9 → 7) antes de secarlo y el otro secado a su pH isoelectrico de extracción (pH 4.9), comparándolas con la de un aislado de soya utilizado como referencia, encontrando que la concentración mínima de gelificación para los dos aislados de lupinus estudiados fueron de 16% (w/v) para el neutralizado y 14% (w/v) para el secado a su pH isoelectrico; mientras que para el aislado proteico de soya fue del 13% (w/v). La menor concentración de gelificación para las albúminas y un aislado proteico de frijoles adzuki (*Vigna angularis* cv Takara), investigada por Tjahjadi *et al.* (1988) fueron 12 y 20% (w/v) respectivamente.

El pH del medio donde se forma el gel y la concentración de la proteína influyen en el comportamiento reológico del gel. Puppo y Añón (1998) obtuvieron geles de aislados proteicos de soya a diferentes valores de pH y a distintas concentraciones proteicas, reportando que la elasticidad y la resistencia a la deformación del gel aumentan a medida que decrece el pH; mientras que la fracturabilidad y la dureza del gel aumentaron a medida que se incrementó el pH. Por otra parte, la resistencia a la deformación y la dureza del gel aumentan con el incremento de la concentración proteica. Una tendencia similar, respecto al efecto del pH, fue observada por Handa *et al.* (1998) en geles preparados con proteínas de la clara de huevo.

#### 4.- VALORACIÓN NUTRICIONAL DE LA SEMILLA DE ÉBANO

El ébano (*Pithecellobium flexicaule* Benth.) es una leguminosa silvestre cuyo rango de distribución comprende el estado norteamericano de Texas y estados del Noreste de la República Mexicana.

En Texas desde las costas de la ensenada de Matagorda hasta la planicie del bajo Río Grande. Abundante en el Condado de Cameron. Comúnmente plantadas en las calles de Brownsville, Texas. En México en los estados de Tamaulipas, Nuevo León y también en Baja California (Vires, 1986).

Respecto al uso de la semilla de ébano en la alimentación humana, el consumo de la misma como complemento alimenticio es tradición en muchas zonas rurales de los estados del Noreste de México, principalmente aquellas ubicadas dentro de su rango de distribución. Las semillas son consumidas cocidas cuando están verdes y tostadas cuando maduras, estas últimas enteras (sin la cáscara) o molidas para ser empleadas como sustituto del café) (Correl y Johnston, 1970; Rocas, 1990; Vires, 1986).

González-Quijada (1996) realizó la evaluación de algunos parámetros nutricionales de semillas de ébano maduras (crudas y tostadas) y tiernas (crudas y cocidas con o sin vaina ni testa), reportando para las semillas maduras contenidos proteicos de alrededor del 35%, en base húmeda, y para

grasa y fibra dietética total valores de 24% y 13%, respectivamente. La digestibilidad verdadera *in vivo* de la proteína, determinada en ensayos con ratas, varió desde 79.3% en las semillas maduras crudas hasta 94.5% en las tiernas cocidas sin vaina y sin testa. La calidad de la proteína de la semilla de esta leguminosa, evaluada mediante la determinación del puntaje aminoacídico corregido por digestibilidad, osciló desde 0.44 en las semillas maduras crudas hasta 0.56 en las cocidas sin vaina y sin testa. En los cotiledones de las semillas maduras crudas se determinaron altos valores de inhibidores de tripsina (204-212 UIT/mg muestra) y contenidos de fitatos de 24-28 mg ácido fítico/ g muestra, los cuales se redujeron por efectos del tratamiento térmico en más del 90% los primeros y en alrededor del 35% los segundos. La concentración de taninos determinada en dichos cotiledones estuvo dentro del rango de 12-15 mg equiv. Catequina/100 g de muestra. El análisis de los aminoácidos reveló que las proteínas de la semilla madura de ébano son de un alto contenido en los aminoácidos esenciales leucina, lisina, valina e isoleucina, con valores del orden de 6.78, 6.22, 5.15 y 3.43 g/100 g proteína, respectivamente; pero bajos en sus contenidos de metionina y cistina (0.76 y 0.65 g/100 g proteína); siendo estos azufrados el primer limitante. En relación a los aminoácidos no esenciales se obtuvieron valores altos de ácido glutámico y de ácido aspártico (14.79 y 8.19 g/100 g proteína, respectivamente).

En estudios realizados por Giral *et al.* (1978) con semillas maduras crudas de ébano no se detectaron presencia de alcaloides ni de hemaglutininas.

Es de hacer notar la falta de información referente a la caracterización fisicoquímica de las proteínas de la semilla de ébano y de sus propiedades funcionales. De igual manera, tampoco se conoce el valor nutricional de sus proteínas después de aisladas del resto de los componentes de la semilla; el cual puede ser diferente en estas condiciones al obtenido cuando se consideran a las proteínas dentro del conjunto total de la semilla.

# HIPÓTESIS

Es posible obtener un aislado proteico de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – con buenas propiedades nutricionales y funcionales.

## OBJETIVOS

### A.- OBJETIVO GENERAL

Caracterizar química, nutricional y funcionalmente a las proteínas de la semilla de ébano como fuente potencial de ingrediente para la industria alimenticia.

### B.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar el perfil de proteínas, de la semilla de ébano, por solubilidad y puntos isoeléctricos.
- 2.- Determinar los pesos moleculares de las proteínas de las fracciones proteicas solubilizadas de la semilla de ébano, mediante electroforesis.

- 3.- Determinar las condiciones óptimas de pH y temperatura para obtener un aislado proteico de la semilla de ébano que contenga la mayor cantidad posible de las proteínas de esa semilla.
- 4.- Valorar química y nutricionalmente al aislado proteico de la semilla de ébano, determinando su calidad proteínica mediante la obtención del puntaje químico aminoacídico corregido por la digestibilidad verdadera de su proteína.
- 5.- Valorar funcionalmente al aislado proteico mediante la medición de su solubilidad y de sus capacidades de gelificación, emulsificación, absorción de agua y grasa y formación de espuma.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.- FUENTE Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Este estudio es continuación de la evaluación nutricional de la semilla de ébano realizada por González-Quijada (1996), en el cual no se encontraron diferencias significativas en la composición de las semillas de esa leguminosa, colectadas en localidades de los municipios General Escobedo, General Terán y Marín del Estado de Nuevo León, México.

Tomando en consideración lo anterior, para la realización de esta investigación se colectaron muestras ( $n = 5$  árboles) de 1 kg de vainas/árbol de ébano, de forma aleatoria, en cada una de las localidades antes mencionadas. Las semillas maduras de las tres submuestras fueron mezcladas homogéneamente para obtener una muestra analítica, después de procesada, de 1 kg de harina desgrasada, en peso seco.

A las semillas se les removió la vaina y la testa, manualmente, siendo procesadas crudas. Los cotiledones fueron molidos en un aparato marca Cofret, modelo 518, y convertidos en harina fina la cual se hizo pasar por mallas de 100 mesh.

La harina se desgrasó con n-hexano, agitando una mezcla harina-solvente en relación 1:10 (w/v) en un agitador Precisión modelo 25 (Scientific Inc. Chicago, Illinois, USA) con baño térmico, ajustado a una amplitud de 8 cms y una frecuencia de oscilación de 80 ciclos/min, a la temperatura de 35°-37°C durante 6 horas; con recambio del solvente a las 3 horas. Posteriormente la harina desgrasada fue desolventizada por secado al aire a temperatura ambiente durante un período aproximado de 16 horas, almacenándose luego en refrigeración a 4°C, sobre material desecante, hasta su uso.

## 2.- PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Los análisis químicos, excepto la determinación del perfil de aminoácidos del aislado proteico y de los pesos moleculares de las proteínas de las fracciones proteicas solubilizadas, fueron realizadas en el Laboratorio de Ciencia de los Alimentos y en el de Microbiología de Suelo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. Se utilizaron en los análisis reactivos grado analítico adquiridos de la Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. USA) y de Casas Comerciales de la ciudad de Monterrey, N.L., México.

## **2.1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA SEMILLA DE ÉBANO**

Para caracterizar las proteínas de la semilla madura de ébano se hicieron las siguientes determinaciones:

### **2.1.1.- COMPOSICIÓN PROXIMAL**

La composición proximal de las harinas desgrasada y sin desgrasar: contenido de proteína, grasa, fibra cruda, humedad y cenizas se determinó por los procedimientos de la AOAC (AOAC, 1990). El contenido de carbohidratos (extracto libre de nitrógeno) fue obtenido por diferencia.

### **2.1.2.- PERFIL DE PROTEÍNAS POR SOLUBILIDAD**

Las proteínas fueron separadas en diferentes fracciones en base a su solubilidad en los siguientes solventes: Agua destilada (albúminas), solución de NaCl al 5% (globulinas), etanol al 70% (prolaminas) y NaOH 0.05 M (glutelinas), usados en esa secuencia de acuerdo al procedimiento descrito por Sauvaire *et al.* (1984) e ilustrado en la Figura 1.

En tubos de centrifuga, de polipropileno, de 50 ml se colocó una mezcla de harina-solvente en relación 1:20 (w/v). Los tubos fueron agitados

durante 20 minutos a 25°C en un aparato Lab-line Incubator Shaker Orbit modelo 3595 (Lab-line Instruments, Inc. Melrose Park, Illinois, USA) ajustado a 150 rpm. Los extractos fueron centrifugados a 25,000 x g a 25°C por 20 minutos, usando una centrifuga Beckman modelo J2-21 (Beckman Instruments, Calif., USA) y los sobrenadantes filtrados (Whatman, No. 1). La extracción con cada solvente fue repetida tres veces sobre la misma muestra de manera secuencial, combinándose los sobrenadantes de las tres extracciones.

El contenido de proteínas en los sobrenadantes fue determinado por dos metodologías: espectrofotométricamente, midiendo la absorción en el ultravioleta a longitudes de onda de 280 y 260 nm (Schleif y Wensink, 1981) en un espectrofotómetro Beckman Du 650 y por el método Kjeldhal ( $N \times 6.25$ ) (AOAC, 1990). Esta última metodología se utilizó también para determinar el contenido proteico en el residuo insoluble.

La conversión de absorbancias a concentración de proteína (mg/ml) se realizó mediante la aplicación de la ecuación 1 mostrada en el apéndice B. El fraccionamiento se hizo por triplicado.

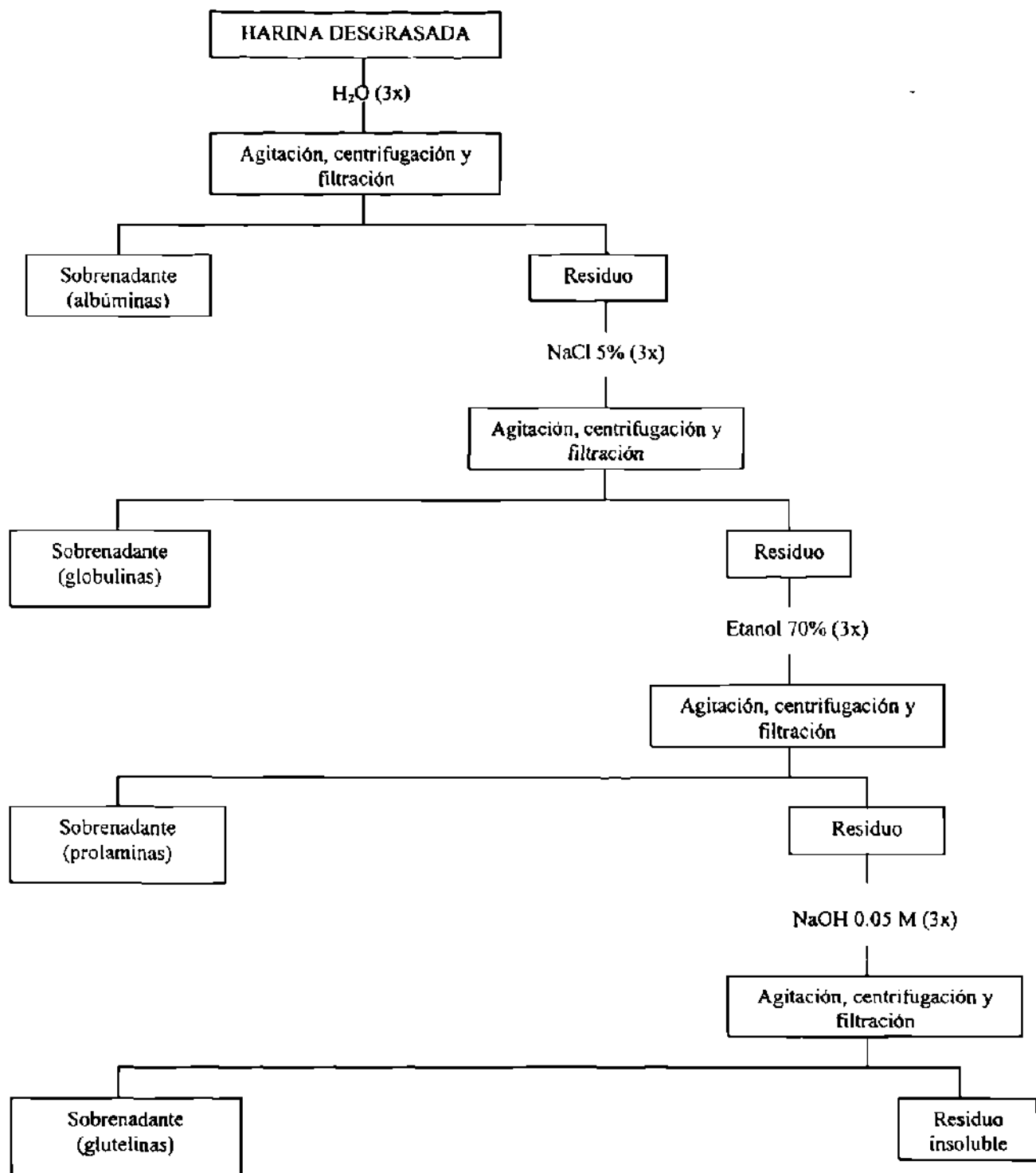


Figura 1.- Esquema del procedimiento usado para fraccionar por solubilidad a las proteínas de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -. 3x indica que la extracción fue repetida 3 veces sobre el residuo.

### **2.1.3.- PUNTOS ISOELÉCTRICOS DE LAS FRACCIONES PROTEICAS SOLUBILIZADAS**

El pH isoelectrico de las diferentes fracciones proteicas solubilizadas fue determinado por la medición del pH de la muestra a la cual ocurrió la máxima precipitación de proteínas después de la adición de HCl 0.1 N o de NaOH 0.1 N (Sethi y Kulkarni, 1993).

Alicuotas de 25 ml de las fracciones proteicas solubilizadas, cuyo contenido de proteínas fue previamente determinado, fueron vertidas en tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml. Se les ajustó el pH por la adición de HCl 0.1 N y/o NaOH 0.1 N a valores comprendidos en el intervalo de 0.5-13.0 con un pH-metro Denver modelo Basic (Denver Instruments, Col., USA). Los tubos fueron agitados por 2 minutos en un Vortex modelo 58223 (McGraw, Park, Ill.), se les recheó el pH, reajustándolo al valor correspondiente donde fue necesario, y posteriormente se centrifugaron a 25,000 x g a 25°C por 20 minutos (en centrifuga Beckman J2-21); filtrándose los sobrenadantes en papel Whatman No. 1.

El contenido de proteínas, tanto en la fracción solubilizada antes del ajuste del pH como en el sobrenadante obtenido después de la centrifugación, fue determinado por medición de la absorción en el ultravioleta a longitudes de onda de 280 y 260 nm (Schleif y Wensink, 1981) en un espectrofotómetro Beckman Du 650. La cantidad de proteína precipitada en cada tubo se determinó por diferencia. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

#### **2.1.4.- PESOS MOLECULARES POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)**

Para determinar los pesos moleculares de las proteínas presentes en las distintas fracciones proteicas solubilizadas se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida, de acuerdo al método de Laemmli descrito por Heredia *et al.* (1998).

La determinación se llevo a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

La SDS-PAGE se efectuó en una cámara electroforética Sigma Tech-Ware conectada a un sistema refrigerante Fisher Scientific modelo 910.

Previo a la electroforesis las muestras de las fracciones proteicas solubilizadas de la semilla de ébano fueron diluidas en relación 1:1 en un amortiguador de solubilización (pH 6.8, 3% tris, 20%  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% SDS, 0.02% azul de bromofenol, y 40% glicerol).

25-30  $\mu$ l de las muestras diluidas se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida discontinuo en condiciones disociantes, con un gel separador al 15% de 1.0 mm de grosor y un gel concentrador al 2.5%. Se aplicó una corriente de 120 V para la concentración de proteínas y 150 V para su separación. El gel se mantuvo a 15°C. Después de la electroforesis las proteínas en el gel fueron teñidas, para su detección, por inmersión del

gel en una solución de azul brillante de Comassie R-250 al 0.1% en metanol al 50% y ácido acético al 10%, durante toda la noche con agitación continua, y posteriormente desteñidas (para eliminar exceso de colorante) en ácido acético al 10% con agitación constante por un período aproximado de 8 horas.

Como marcadores de pesos moleculares se utilizó el estándar de proteínas SDS-6H obtenido de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. USA) compuesto de miosina (peso molecular [PM] 205 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (PM 116 kDa), fosforilasa b (PM 97.4 kDa), albúmina de bovino (PM 66 kDa), ovoalbúmina (PM 45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa). La corrida electroforética se efectuó por duplicado sobre el mismo gel.

## 2.2.- DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE pH Y TEMPERATURA PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

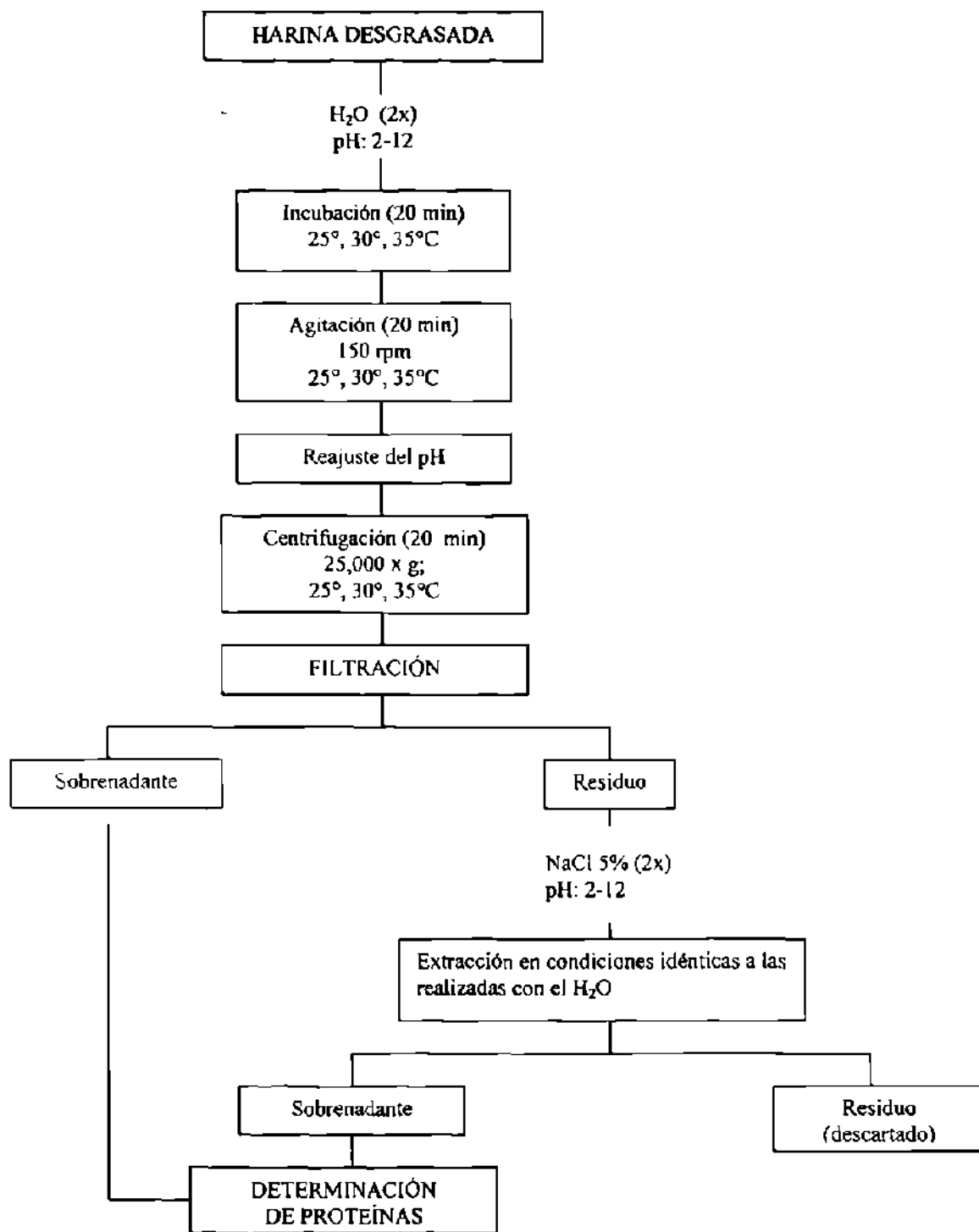
Se ensayaron diferentes combinaciones de pH y temperatura para determinar las condiciones de máxima extracción proteica, en base a la metodología de Bello y Okezie (1989) adaptada a las características particulares de las proteínas en estudio.



Las proteínas fueron extraídas con agua destilada y con solución de NaCl al 5% (ajustadas al pH correspondiente) en cuatro extracciones consecutivas (dos con cada extractante) sobre el mismo residuo, combinándose los sobrenadantes de todas las extracciones como se esquematiza en la Figura 2. Se probaron temperaturas de extracción de 25°, 30° y 35°C y valores de pH comprendidos dentro del intervalo 2.0-12.0.

Previamente a la extracción se ajustó el pH de los extractantes al valor correspondiente, mediante la adición de HCl 0.1 N y/o NaOH 0.1 N, con un pH-metro Denver modelo Basic. Los extractantes fueron mantenidos a la temperatura de extracción en un baño térmico Precision (Precision Scientific Co. Chicago, Illinois, USA).

En tubos de centrifuga de polipropileno se colocaron mezclas harina-extractante en relación 1:20 (w/v). Los tubos fueron incubados por 10 minutos en un baño térmico (Precision Scientific) a la temperatura de extracción correspondiente, agitados durante 20 minutos a la misma temperatura en un agitador Lab-line Incubator Shaker Orbit modelo 3595, a 150 rpm. Se les recheó el pH, reajustándolo donde fue necesario, y posteriormente fueron centrifugados a 25,000 x g por 20 minutos a la temperatura de extracción (centrifuga Beckman J2-21). Los sobrenadantes se filtraron (Whatman, No. 1) y fueron analizados para proteína en un espectrofotómetro Beckman Du 650, midiéndose la absorción en el ultravioleta a longitudes de onda de 280 y 260 nm. Las determinaciones a cada pH y temperatura se hicieron por triplicado.



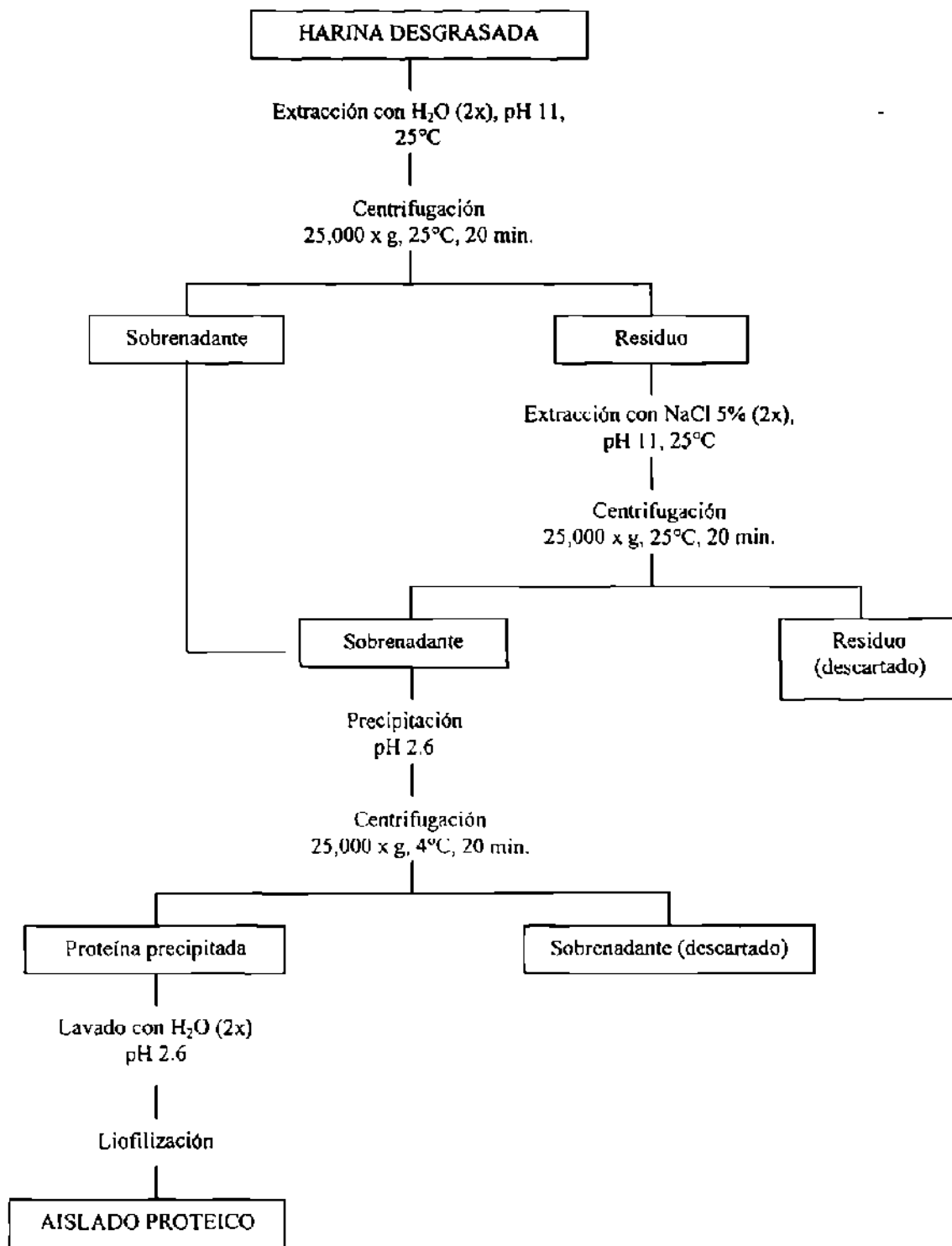
**Figura 2.-** Diagrama del procedimiento de extracción de proteínas de la harina desgrasada de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -. 2x indica que la extracción se repitió dos veces con el mismo extractante.

## 2.3.-OBTENCIÓN DEL AISLADO PROTEICO

Para la obtención del aislado proteico de la semilla madura de ébano se tomaron como base los resultados de las investigaciones previamente realizadas, respecto al punto isoelectrico de las fracciones proteicas de la semilla y las condiciones de pH y temperatura donde la extracción de proteínas fue máxima.

La harina desgrasada fue sometida a cuatro extracciones consecutivas, sobre la misma muestra, con agua destilada y con solución de NaCl al 5%, ajustadas ambas a pH 11, a la temperatura de 25°C (dos con cada extractante); combinándose los sobrenadantes de todas las extracciones. Las proteínas fueron precipitadas de los sobrenadantes, isoelectricamente, a pH 2.6, obteniéndose el aislado de acuerdo al procedimiento ilustrado en la Figura 3 y descrito a continuación.

En frascos de centrifuga de polipropileno de 250 ml se colocaron muestras harina-extractante (pH 11) en relación 1:20 (w/v). Los frascos fueron incubados a 25°C por 10 minutos (en baño térmico Precision Scientific), agitados por 20 minutos a 25°C y 150 rpm (Lab-line Incubator Shaker Orbit, modelo 3595); reajustándose el pH a 11 donde fue necesario. Los extractos fueron centrifugados a 25,000 x g por 20 minutos a 25°C (centrifuga Beckman J2-21) y los sobrenadantes filtrados (Whatman, No. 1). A los sobrenadantes se les ajustó el pH a 2.6 con HCl 0.1 N para la precipitación isoelectrica de las proteínas. La proteína precipitada fue separada por centrifugación (a 25,000 x g, 4°C por 20 minutos) y posterior decantación.



**Figura 3.-** Diagrama del procedimiento de obtención del aislado proteico de la semilla de ébano. 2x indica que la extracción fue repetida dos veces.

El aislado proteico obtenido fue lavado dos veces con agua destilada ajustada a pH 2.6, secado por liofilización, durante 24 horas, en una liofilizadora Labconco Freezone 6 y almacenado en refrigeración a 4°C, sobre material desecante, hasta su uso.

## **2.4.- VALORACIÓN NUTRICIONAL DEL AISLADO PROTEICO**

Al aislado proteico obtenido de la semilla madura de ébano se le practicaron los siguientes análisis para su evaluación químico-nutricional:

### **2.4.1.- COMPOSICIÓN PROXIMAL**

La composición proximal del aislado fue determinada por los procedimientos de la AOAC (AOAC, 1990).

### **2.4.2.- PERFIL DE AMINOÁCIDOS**

El perfil de aminoácidos del aislado proteico se determinó en el Laboratorio de Química y Análisis 323 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, México, D.F.

La determinación de aminoácidos se realizó por cromatografía de intercambio iónico con previa hidrólisis ácida de la proteína no oxidada, a excepción del triptofano, para el que se hizo una hidrólisis alcalina.

#### **a) HIDRÓLISIS ÁCIDA**

En la determinación de todos los aminoácidos, excepto triptofano, el aislado proteico fue hidrolizado de acuerdo a la metodología establecida por Moore y Stein (1963).

1 mg del aislado fue hidrolizado con 200  $\mu$ l de HCl 6 N, de punto de ebullición constante (Pierce), en una unidad de hidrólisis Pico-Tag a la temperatura de 110°C durante 24 horas en atmósfera inerte (vacío/nitrógeno de alta pureza). El HCl remanente fue evaporado bajo vacío y los hidrolizados secos disueltos en agua (dilución 1:10) y filtrados a través de membranas de 0.22 micras. Se tomaron alicuotas de 50  $\mu$ l del hidrolizado diluído para las corridas cromatográficas.

#### **b) HIDRÓLISIS ALCALINA**

Para determinar al triptofano el aislado proteico fue sometido a hidrólisis alcalina según la metodología descrita por Pellet y Young (1980).

1-8 mg del aislado fue hidrolizado con NaOH 5 N, utilizándose almidón de papa, parcialmente hidrolizado y deshidratado, como agente reductor. La hidrólisis se efectuó en una unidad Pico-Tag a 110°C durante 16 horas en atmósfera inerte de alto vacío. El hidrolizado fue disuelto en 1 ml de buffer de citrato de sodio a pH 4.25, neutralizado con HCl 6 N sobre baño de hielo, diluido en relación 1:10 en buffer de citrato de sodio a pH 4.25 y filtrado a través de membranas de 0.22 micras. Alicuotas de 50 µl del hidrolizado diluido fueron tomadas para la cuantificación cromatográfica.

### c) **CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS**

La determinación de los aminoácidos en hidrolizados y estándares se llevo a cabo en un autoanalizador de aminoácidos Technicon modelo NC-2P, provisto de columnas de intercambio iónico. Como sistema de elución se utilizaron buffers de citrato de sodio a pH 3, 4 y 6, con un programa de temperatura de 53-77°C. La detección se realizó por reacción post-columna con ninhidrina a 570 y 440 nm. La cuantificación se hizo por el método del estándar externo. El análisis se realizó por duplicado.

#### **2.4.3.- COMPUESTOS ANTINUTRICIONALES**

Se cuantificaron los siguientes compuestos antinutricionales:

### 2.4.3.1.- TANINOS

Fueron determinados por el método del HCl-vainillina, modificado por Preece *et al.* (1978) y Desphande y Cheryan (1985).

Los taninos en 2 gramos del aislado proteico fueron extraídos con 10 ml de HCl al 1% en metanol, mediante agitación mecánica a 30°C durante 60 minutos, en un agitador Precision, modelo 25 (Scientific Inc. Chicago, USA), con baño térmico, ajustado a una amplitud de 8 cms y una frecuencia de oscilación de 70 ciclos/min. Los extractos fueron centrifugados a 1,500 rpm durante 10 minutos en una centrifuga Solbat, modelo C-300.

Alicuotas de 1 ml del sobrenadante se hicieron reaccionar a 30°C durante 20 minutos con 5 ml de una mezcla de volúmenes iguales de vainillina al 1% en metanol y HCl al 8% en metanol. En las mismas condiciones se corrió un blanco de muestra, adicionando a una segunda alícuota 5 ml de HCl al 4% en metanol. Se construyó una curva normal de catequina en concentraciones de 0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 y 0.30 mg/ml. Las absorbancias fueron leídas a 500 nm, en un espectrofotómetro Coleman, modelo 6/35. Los análisis fueron hechos por triplicado, con un triplicado de lectura para cada determinación. A las lecturas de las absorbancias con la vainillina se les sustrajeron las del blanco de muestra correspondiente.



### 2.4.3.2.- FITATOS

El contenido de ácido fítico en el aislado fue determinado mediante una modificación del procedimiento de extracción de Wheeler y Ferrel, propuesta por Davis (1981). Tres gramos del aislado proteico fueron extraídos con 30 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 3%, en agitación mecánica a temperatura ambiente por 45 minutos, utilizando un agitador Lab-line Incubator Shaker Orbit modelo 3595, a 200 rpm. Los extractos fueron después centrifugados a 4°C por 15 minutos a 15,000 x g en centrifuga Beckman J2-21. El fitato fue precipitado de 10 ml del sobrenadante con FeCl<sub>3</sub> al 1% en TCA al 3%, digerido con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2% en TCA al 3% por 35 minutos, lavado con TCA y agua destilada y vuelto a digerir con NaOH 1.5 N por 30 minutos; removiéndose posteriormente el precipitado de Fe(OH)<sub>3</sub> por centrifugación. La materia orgánica en el sobrenadante fue digerida con una mezcla 6:1 de HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrados y los pirofosfatos hidrolizados con agua destilada en baño de agua hirviente por 90 minutos. Alicuotas de la solución resultante (después de aforada a 100 ml con agua destilada) fueron tratadas con molibdato de amonio al 6.6%, ácido sulfúrico 7.5 N y sulfato ferroso heptahidratado al 5%, agitándose después de cada adición en un Vortex, modelo 58223 (McGraw, Park, Illinois, USA). Después de 20 minutos de la adición del sulfato ferroso, fueron leídas las absorbancias a 660 nm en un espectrofotómetro Coleman, modelo 6/35 para la determinación del fósforo fítico. Se corrió una curva estándar con concentraciones de 0, 25, 50, 75 y 100 ppm de fitato de sodio, digerida y tratada en las mismas condiciones que las muestras. Los análisis se hicieron por triplicado, con un triplicado de

lectura contra un blanco de reactivo para cada determinación. El ácido fítico fue cuantificado asumiendo que contiene 28.2% de fósforo en peso.

### **2.4.3.3.- INHIBIDORES DE TRIPSINA**

Se determinó la actividad de los inhibidores de tripsina en el aislado de acuerdo a la metodología propuesta por Kakade *et al.* (1974).

1 gramo del aislado proteico fue extraído con 50 ml de NaOH 0.01 N a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de la dilución apropiada, en cada caso, porciones de 0, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8 y 2.0 ml del extracto fueron incubados con tripsina (en HCl 0.001 M) y clorhidrato de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPA) en un baño a 37°C durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se detuvo la reacción por la adición de ácido acético al 30%. Las absorbancias fueron leídas a 410 nm contra un blanco de reactivo, en un espectrofotómetro Coleman, modelo 6/35 y corregidas por un blanco de muestra. Los análisis fueron hechos por cuadruplicado. La actividad del inhibidor de tripsina fue expresada en UIT (Unidad Inhibidora de Tripsina), definiéndose una UIT como el incremento de 0.01 unidades de absorbancia en una mezcla de reacción de 10 ml medida a 410 nm en las condiciones anteriormente descritas.

#### **2.4.4.- DIGESTIBILIDAD *in vivo***

Se determinó la digestibilidad verdadera *in vivo* del aislado proteico de la semilla de ébano mediante un bioensayo con ratas de la raza Sprague-Dawley, de acuerdo a la metodología establecida por la FAO/OMS/UNU (Joint FAO/WHO Expert Consultation, 1989). El ensayo fue realizado en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y durante el mismo se utilizaron 16 ratas macho de 21 días de nacidos con pesos que oscilaban entre 50-70 gramos. Los animales se dividieron en dos grupos de acuerdo al peso (de 8 ratas cada uno) para ensayar las dos dietas: la de prueba y otra usada como control.

##### **2.4.4.1.- FORMULACIÓN DE LAS DIETAS**

Se preparó una dieta de prueba en base a la proteína del aislado estudiado y otra control (libre de nitrógeno) para determinar el nitrógeno fecal endógeno.

La composición porcentual de las dietas, en base seca, fue la siguiente:

- a) **DIETA DE PRUEBA:** 10% de proteína del aislado ensayado, 10% de grasa total (ajustada con aceite de maíz), 5% de fibra total (ajustada con fibra de avena; Pfizer, México, D.F.), 1% de mezcla de vitaminas

y minerales (Ciba-Geigy, México, D.F.) la mezcla de todos los ingredientes se ajustó a un 100% con almidón de maíz.

- b) **DIETA CONTROL (LIBRE DE NITRÓGENO):** Se preparó con la misma composición base de la anterior, pero sin proteínas.

#### **2.4.4.2.- CONDICIONES DEL BIOENSAYO**

Las ratas fueron colocadas en jaulas individuales en condiciones ambientales de 18°-26°C y 40-70% de humedad relativa. Cada grupo de ratas fue distribuido en dos bloques de 4 animales, en base al peso, de tal manera que la diferencia entre ellos no fuera mayor de 5 gramos.

Después de un período de aclimatación de 4 días, cada uno de los dos grupos fue alimentado con su dieta correspondiente. Durante un lapso de 5 días se colectaron las heces de cada rata y se registró el peso del alimento ingerido. Las heces fueron secadas y pesadas, contabilizándose su peso por cada animal.

Se determinó la humedad y el % de nitrógeno, por el método de Kjeldahl (AOAC, 1990), del alimento y de las heces excretadas por cada rata.

## **2.4.5.- EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA PROTEÍNA**

La calidad de la proteína del aislado obtenido de la semilla madura de ébano fue evaluada mediante el *puntaje químico aminoacídico corregido* por la digestibilidad verdadera. Este puntaje fue calculado siguiendo el procedimiento recomendado por la Joint FAO/WHO Expert Consultation (1989), utilizando como referencia el patrón de requerimientos de aminoácidos esenciales para niños de edad pre-escolar, establecido por la FAO/OMS/UNU en 1991, el cual se muestra en la Tabla 4B del apéndice B.

## **2.5.- VALORACIÓN FUNCIONAL DEL AISLADO PROTEICO**

La funcionalidad del aislado proteico de la semilla de ébano fue evaluada mediante la determinación de las siguientes propiedades:

### **2.5.1.- SOLUBILIDAD**

El perfil de solubilidad del aislado proteico fue determinado de acuerdo al procedimiento descrito por Bera y Mukherjee (1989).

125 mg del aislado proteico fueron dispersados en 25 ml de agua desionizada, en tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml. El pH de las dispersiones fue ajustado con NaOH 0.1 N y/o HCl 0.1 N a valores comprendidos en el intervalo 1.0 – 11.0, utilizando un pH-metro Denver, modelo Basic. Los tubos fueron agitados por 30 minutos a la temperatura ambiente en un agitador Lab-line Incubator Shaker Orbit modelo 3595, operando a 150 rpm. Se les midió de nuevo el pH, reajustándolo donde fue necesario, y posteriormente fueron centrifugados a 4350 x g por 30 minutos a 25°C (centrifuga Beckman J2-21), filtrándose los sobrenadantes.

El contenido de nitrógeno en los sobrenadantes fue determinado por el método de Kjeldhal (AOAC, 1990). Los análisis se hicieron por triplicado.

### **2.5.2.- ABSORCIÓN DE AGUA**

La capacidad de absorción de agua del aislado proteico fue determinada por el método desarrollado por Naczk *et al.*, descrito por Xu y Diosady (1994).

2 gramos del aislado proteico fueron pesados en tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml y dispersados en 16 ml de agua destilada. Cada 10 minutos se agitó el contenido de los tubos con una varilla de vidrio, por 30 segundos, hasta un período total de 70 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 2,000 x g por 15 minutos a 25°C (centrifuga Beckman J2-21). Luego se decantó cuidadosamente el sobrenadante y se dejaron

drenando los tubos en posición invertida durante 15 minutos. Posteriormente fueron pesados. El agua absorbida se expresó como el porcentaje de incremento en peso de la muestra. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

### **2.5.3.- ABSORCIÓN DE GRASA**

La determinación de la capacidad de absorción de grasa del aislado proteico se hizo de acuerdo a la metodología descrita por Xu y Diosady (1994).

El procedimiento experimental realizado fue idéntico al efectuado para determinar la capacidad de absorción de agua del aislado, descrito anteriormente, con la diferencia que se utilizó aceite de maíz en lugar de agua y las dispersiones aceite-aislado fueron agitadas cada 5 minutos en vez de 10, por un período total de 30 minutos.

### **2.5.4.- CAPACIDAD EMULSIFICANTE**

Para determinar la capacidad emulsificante del aislado proteico se siguió la metodología propuesta por Swamylingappa y Srinivas (1994).

Dispersiones al 4% (w/v) del aislado proteico en agua destilada fueron agitadas durante 30 segundos en una batidora Oster modelo 2520 (Sumbeam

Oster Household Products, Memphis, Tn., USA), operando a baja velocidad. La mezcla se mantuvo en agitación constante con la batidora mientras se le adicionaba, desde una bureta, aceite de maíz a una velocidad de 0.4 ml/segundos hasta la observación visual de una separación de fases. Se midieron los mililitros de aceite agregados hasta la ruptura de la emulsión. La capacidad emulsificante se expresó como ml de aceite emulsificado por gramo de proteína. El procedimiento fue repetido con dispersiones al 4% (w/v) del aislado proteico en soluciones de NaCl en concentraciones 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 M. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

#### **2.5.5.- CAPACIDAD ESPUMANTE**

La capacidad espumante del aislado proteico y la estabilidad de la espuma fueron determinadas de acuerdo al procedimiento propuesto por Swamylingappa y Srinivas (1994).

Dispersiones al 1% (w/v) del aislado proteico en agua destilada fueron agitadas por 5 minutos en una batidora Oster modelo 2520, operando a alta velocidad. Seguidamente se transfirió el contenido, junto con la espuma, a una probeta de 250 ml, midiéndose el volumen de la espuma después de transcurridos 30 segundos. La capacidad espumante del aislado fue expresada como el % de incremento en volumen.



Para determinar la estabilidad de la espuma formada, se midió el volumen de la espuma que permaneció en la probeta después de un período de 20, 40, 60 y 120 minutos. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

#### **2.5.6.- CAPACIDAD DE GELIFICACIÓN**

Para determinar la capacidad de gelificación del aislado proteico se utilizó el método de Coffmann y García, modificado por Desphande *et al.*, como lo describe Singhal y Kulkarni (1991).

Dispersiones al 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16% (w/v) del aislado proteico en un volumen de 5 ml de agua destilada fueron preparadas en tubos de ensayos Pyrex. Los tubos se calentaron durante 1 hora en baño de agua hirviendo, seguido de un rápido enfriamiento por inmersión en agua fría. Posteriormente fueron almacenados en refrigeración a 4°C por 2 horas. Transcurrido ese tiempo se colocaron a temperatura ambiente en posición invertida para determinar en cual(es), se derramaba o goteaba líquido.

La mínima concentración a la cual no se derramó el contenido del tubo se tomó como la capacidad de gelificación mínima del aislado, expresada como % w/v. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

### 3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), completamente aleatorio, para evaluar los resultados obtenidos en la determinación del perfil de proteínas de la semilla madura de ébano; y un análisis de regresión no lineal entre el pH y la cantidad de proteína precipitada, para la determinación del punto isoelectrico de las fracciones proteicas solubilizadas por medio de cálculo diferencial.

Para valorar los resultados de la determinación de las condiciones óptimas para la obtención del aislado proteico se realizó un ANOVA factorial (dos factores: pH y temperatura). Las diferencias entre temperaturas y entre valores de pH fueron evaluadas independientemente por un ANOVA de una sola vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey en los análisis que resultaron significativos.

Se obtuvieron estadísticas descriptivas para cada variable determinada en la valoración nutricional y funcional del aislado proteico y se hizo un análisis de regresión no lineal entre el pH y el % de solubilidad del aislado.

Los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando el programa computacional SPSS. Un valor de  $P \leq 0.05$  fue considerado significativo.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA SEMILLA DE ÉBANO

### 1.1.- COMPOSICIÓN PROXIMAL

La composición proximal de la semilla madura de ébano, sin desgrasar y después de desgrasada, se muestra en la Tabla 1 y en la Figura 4.

Los valores F, calculados mediante el análisis de varianza de una sola vía aplicado a los resultados antes señalados, se presentan en la Tabla 1A del apéndice A.

Las diferencias observadas en la Tabla 1 en los contenidos de proteínas, grasa, cenizas y carbohidratos (extracto libre de nitrógeno) son altamente significativas ( $P < 0.01$ ) y pueden atribuirse a efectos del tratamiento de desgrasado al cual fue sometido la harina de la semilla de ébano. Es de señalar que la extracción de grasa con n-hexano disminuyó el contenido de este nutriente en más del 93%. La pérdida de grasa en la harina determina que se incrementen los contenidos porcentuales de las otras variables incluídas en la composición proximal.

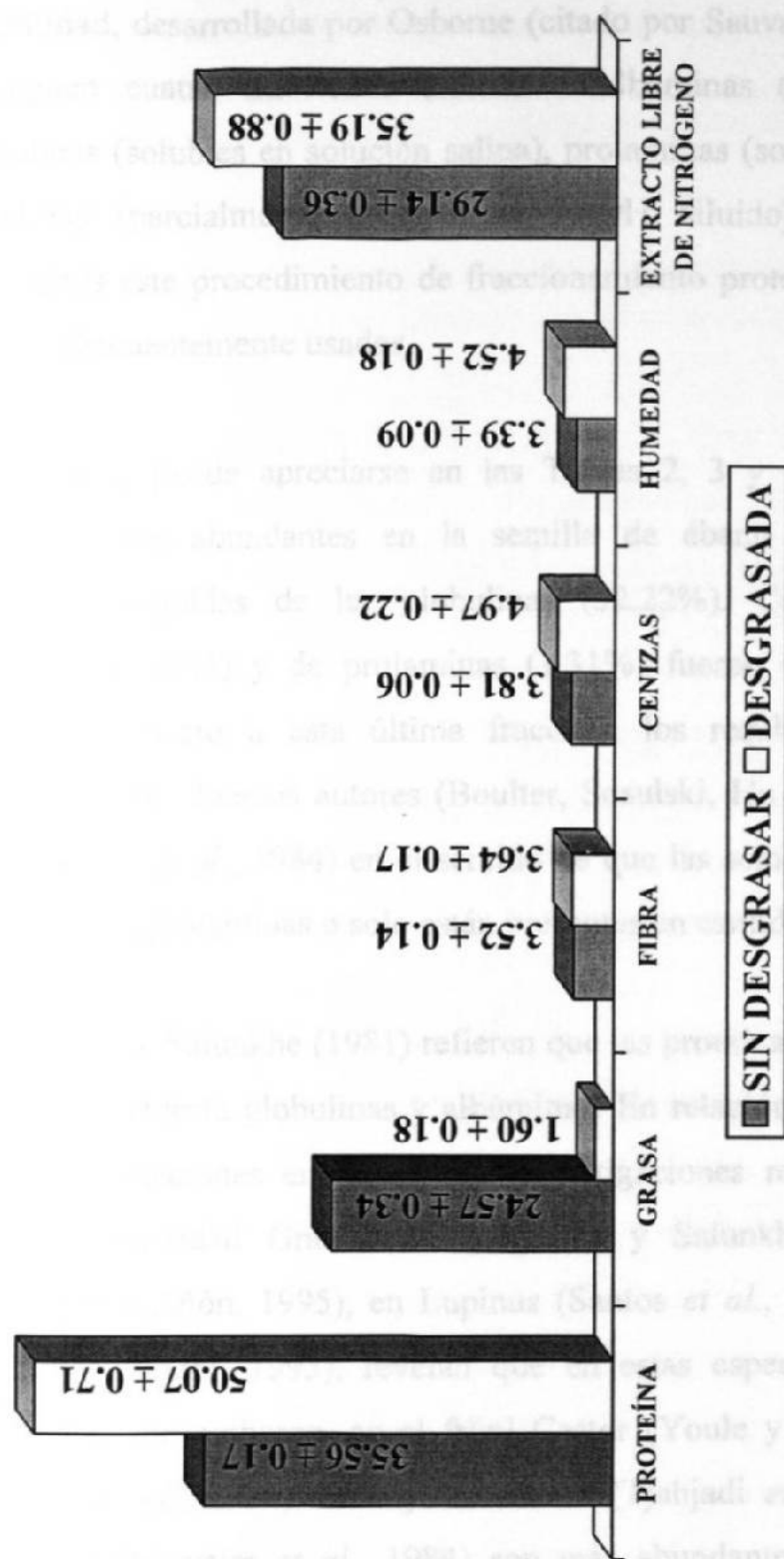
## 1.2.- PERFIL DE PROTEÍNAS POR SOLUBILIDAD

Los resultados de la extracción secuencial de proteínas con los cuatro solventes utilizados en el fraccionamiento proteico de la semilla madura de ébano, son presentados en la Tabla 2 y Figura 5, expresados como porcentajes del total del contenido proteínico de la harina desgrasada. En la Tabla 3 se muestran los mismos resultados en función de la composición total de la semilla desgrasada.

**Tabla 1.-** Composición proximal de la harina obtenida de los cotiledones de la semilla madura de ébano <sup>11</sup> - *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – sin desgrasar y después de desgrasada con n-hexano.

COMPONENTE	SIN DESGRASAR	DESGRASADA
PROTEÍNA (%) (N x 6.25)	35.56 ± 0.17	50.07 ± 0.71
GRASA (%)	24.57 ± 0.34	1.60 ± 0.18
FIBRA (%)	3.52 ± 0.14	3.64 ± 0.17
CENIZAS (%)	3.81 ± 0.06	4.97 ± 0.22
HUMEDAD (%)	3.39 ± 0.09	4.52 ± 0.18
EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO (%)	29.14 ± 0.36	35.19 ± 0.88

<sup>11</sup> Valores promedios de tres repeticiones ± desviación estándar, en base húmeda.



**Figura 4.-** Composición proximal (%) de la harina obtenida de los cotiledones de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – sin desgrasar y después de desgrasada con n-hexano. Los valores son promedios de tres determinaciones ± desviación estándar en base húmeda.

En la clasificación de las proteínas vegetales de acuerdo a su solubilidad, desarrollada por Osborne (citado por Sauvaire *et al.*, 1984), se distinguen cuatro fracciones diferentes: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en solución salina), prolaminas (solubles en alcohol) y glutelinas (parcialmente solubles en NaOH diluído). En este estudio adoptamos este procedimiento de fraccionamiento proteico, por ser uno de los más frecuentemente usados.

Como puede apreciarse en las Tablas 2, 3 y en la Figura 5, las proteínas más abundantes en la semilla de ébano son las albúminas (54.62%), seguidas de las globulinas (32.22%). Contenidos bajos de glutelinas (5.77%) y de prolaminas (1.31%) fueron encontradas en esta semilla. Respecto a esta última fracción, los resultados confirman lo enunciado por diversos autores (Boulter, Sosulski, Hu y Esen, etc. citados por Sauvaire *et al.*, 1984) en el sentido de que las semillas de leguminosas no contienen prolaminas o solo están presentes en cantidades muy pequeñas.

Sathe y Salunkhe (1981) refieren que las proteínas de las leguminosas son en su mayoría globulinas y albúminas. En relación a la abundancia de estas dos fracciones en la semilla, investigaciones realizadas en frijoles comunes, variedad Gran Norteño (Sathe y Salunkhe, 1981), en soya (Petrucci y Añón, 1995), en *Lupinus* (Santos *et al.*, 1997), en *Leucaena* (Setti y Kulkarni, 1993), revelan que en estas especies predominan las globulinas. Sin embargo, en el frijol Castor (Youle y Huang, citados por Sauvaire *et al.*, 1984), en frijoles adzuki (Tjahjadi *et al.*, 1988) y en el fenogreco (Sauvaire *et al.*, 1984) son más abundantes las albúminas. El fraccionamiento proteico de la semilla de ébano es concordante, aunque no

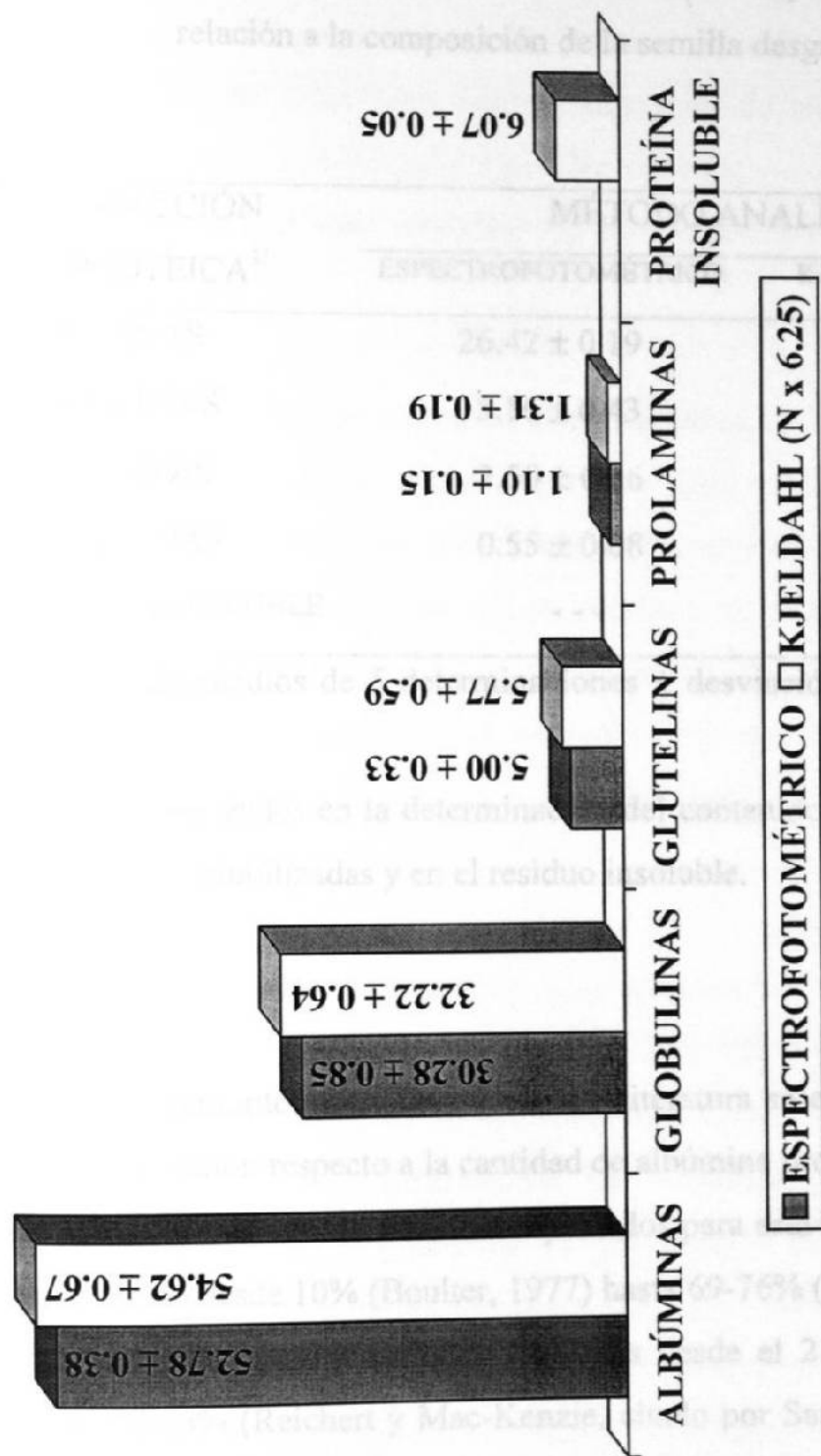
en cantidad, con estos últimos reportes mencionados. La cantidad de glutelinas en la semilla de ébano es similar a la reportada por Boulter (1977) en soya y por Reichert y Mac-Kenzie (citado por Sauvaire *et al.*, 1984) en guisantes.

**Tabla 2.-** Fracciones proteicas en la harina desgrasada de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – expresadas como % en relación al contenido total de proteínas de la semilla.

FRACCIÓN PROTEICA <sup>1/</sup>	MÉTODO ANALÍTICO <sup>2/</sup>	
	ESPECTROFOTOMÉTRICO	KJELDAHL (N x 6.25)
ALBÚMINAS	52.78 ± 0.38	54.62 ± 0.67
GLOBULINAS	30.28 ± 0.85	32.22 ± 0.64
GLUTELINAS	5.00 ± 0.33	5.77 ± 0.59
PROLAMINAS	1.10 ± 0.15	1.31 ± 0.19
PROTEÍNA INSOLUBLE	---	6.07 ± 0.05

<sup>1/</sup> Valores promedios de 5 determinaciones ± desviación estándar, en base húmeda.

<sup>2/</sup> Métodos utilizados para determinar el contenido proteico en las fracciones solubilizadas y en el residuo insoluble.



**Figura 5.-** Fracciones proteicas (%) en la harina desgrasada de la semilla madura de ébano - *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) - en relación al contenido total de proteínas de la semilla. Los valores son media de 5 determinaciones ± desviación estándar, en base húmeda.



**Tabla 3.-** Fracciones proteicas en la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – expresadas como % en relación a la composición de la semilla desgrasada.

FRACCIÓN PROTEICA <sup>1/</sup>	MÉTODO ANALÍTICO <sup>2/</sup>	
	ESPECTROFOTOMÉTRICO	KJELDAHL (N x 6.25)
ALBÚMINAS	26.42 ± 0.19	27.34 ± 0.33
GLOBULINAS	15.16 ± 0.43	16.13 ± 0.32
GLUTELINAS	2.50 ± 0.16	2.89 ± 0.29
PROLAMINAS	0.55 ± 0.08	0.66 ± 0.10
PROTEÍNA INSOLUBLE	---	3.04 ± 0.02

<sup>1/</sup> Valores promedios de 5 determinaciones ± desviación estándar, en base húmeda.

<sup>2/</sup> Métodos utilizados en la determinación del contenido de proteínas en las fracciones solubilizadas y en el residuo insoluble.

Es importante mencionar que en la literatura se encuentra un amplio rango de variación respecto a la cantidad de albúmina presente en una misma especie de leguminosa. Los valores reportados para esta fracción proteica en la soya varían desde 10% (Boulter, 1977) hasta 69-76% (Sosulski, citado por Sauvaire *et al.*, 1984) y para los guisantes desde el 21% (Boulter, 1977) hasta el 80-85% (Reichert y Mac-Kenzie, citado por Sauvaire *et al.*, 1984). Bhatti, 1982 atribuye las discrepancias en los resultados publicados al método de extracción de albúminas y la subsecuente separación de las

globulinas. Aunque Badui (1993) menciona que las globulinas son prácticamente insolubles en agua, existe la posibilidad de que pequeñas porciones de estas proteínas puedan haberse solubilizado junto con las albúminas, debido a las sales neutras existentes de manera natural en la semilla de ébano y por efectos del pH. No obstante, se observan diferencias (como se puede ver más adelante) en la composición electroforética de ambas fracciones.

Además de las fracciones proteicas solubles, se encontró un 6% de proteínas insolubles en la semilla de ébano. Este residuo insoluble puede estar compuesto de proteínas de naturaleza fibrosa y/o de proteínas asociadas con carbohidratos no solubles o con residuos de grasa. También puede consistir de péptidos insolubles provenientes de fracciones proteicas parcialmente hidrolizadas por el procedimiento de extracción o por el desgrasado previo de la harina; o ser una combinación de todos estos polímeros mencionados.

En la Tabla 2A del apéndice A se reportan los valores F obtenidos mediante la aplicación del ANOVA de una vía a los resultados del fraccionamiento proteico, por las dos metodologías analíticas utilizadas para la cuantificación de la proteína en las fracciones solubles. Para las albúminas, globulinas y glutelinas se encontraron diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) o significativas ( $P < 0.05$ ) en los contenidos de proteína determinados por los dos métodos, pero estas diferencias no fueron significativas para las prolaminas ( $P > 0.05$ ). Como se puede ver en las Tablas 2 y 3, la cantidad de proteína determinada por el método de Kjeldahl siempre fue mayor a la cuantificada por el método espectrofotométrico. Esto puede

explicarse por la naturaleza de las dos metodologías. El de Kjeldahl cuantifica el nitrógeno total presente en la muestra (tanto proteico como no proteico), mientras que el espectrofotométrico determina solo al nitrógeno proteico; debido a que se fundamenta en la absorción en el ultravioleta a 280 nm por los grupos cromóforos de tirosina y triptofano existentes en la proteína, con una corrección a 260 nm para la interferencia de los ácidos nucleicos.

Las diferencias no significativas en el caso de las prolaminas podrían atribuirse al contenido muy bajo de estas proteínas en la semilla, lo cual determina que no exista discriminación estadística en las cantidades de prolaminas cuantificadas por los dos métodos.

### **13.- PUNTOS ISOELÉCTRICOS DE LAS FRACCIONES PROTEICAS SOLUBILIZADAS**

Los puntos isoeléctricos determinados en las principales fracciones proteicas de la semilla madura de ébano se muestran en la Tabla 4. La cantidad de proteína precipitada, en función del pH, en las albúminas, globulinas y glutelinas están representadas en las Figuras 6, 7 y 8 respectivamente. Los valores correspondientes pueden verse en las Tablas 1B, 2B y 3B del apéndice B.

Como se puede apreciar en las figuras y tablas antes mencionadas, las mayores cantidades de proteína precipitada, en las tres fracciones proteicas

estudiadas, se determinaron a valores de pH correspondientes a la región ácida (pH<7). Estos resultados son concordantes con lo referido en la literatura por diversos autores (Summer *et al.*, 1981; Thanh y Shibasaki, 1976; Setti y Kulkarni, 1993; Badui, 1993, etc.) quienes mencionan que los puntos isoeléctricos de la mayoría de las proteínas vegetales se localizan a valores de pH ácidos.

**Tabla 4.-** Valores del pH isoeléctrico de las principales fracciones proteicas de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -, obtenidos experimentalmente y mediante cálculo diferencial de puntos máximos de precipitación proteínica.

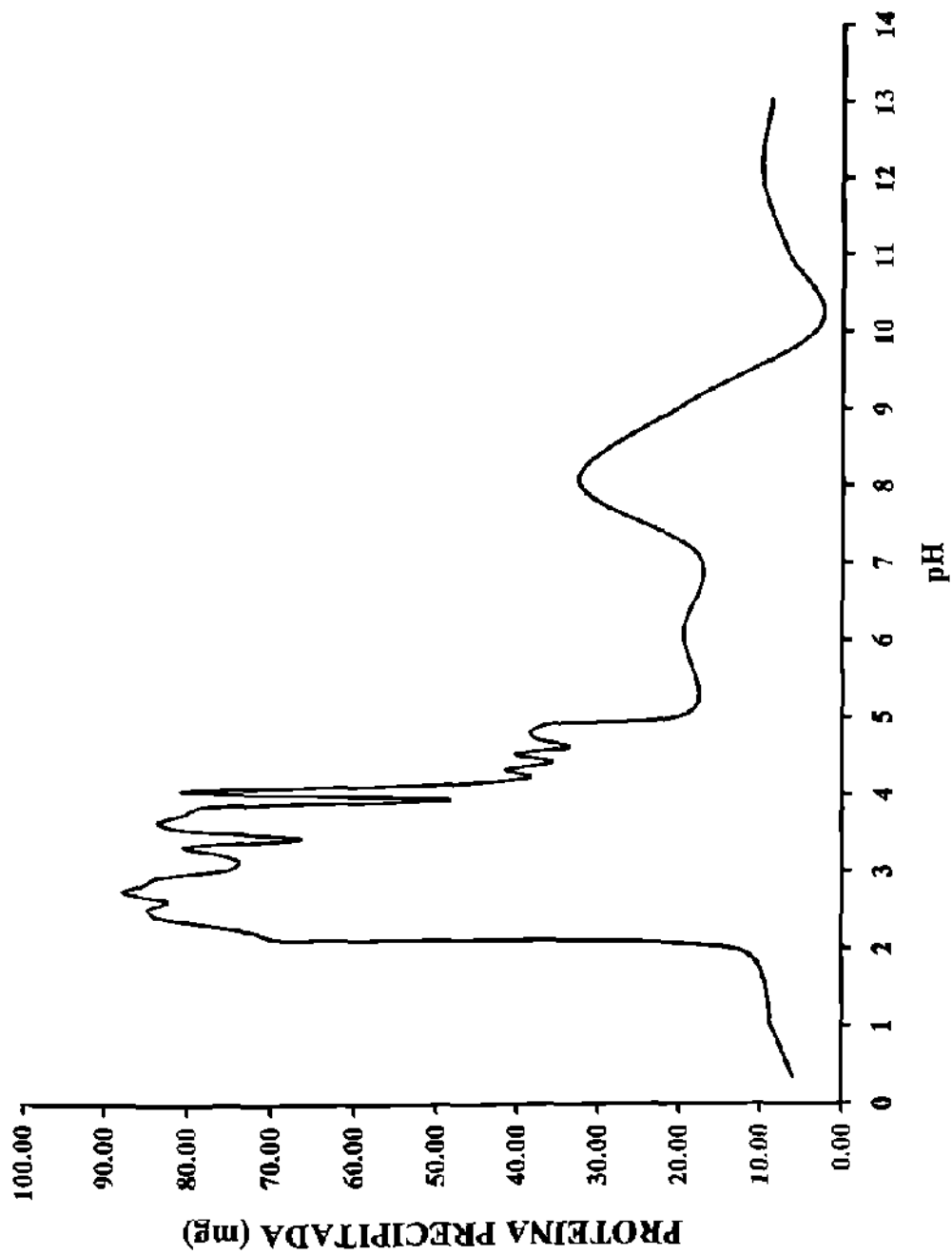
FRACCIÓN PROTEICA	pH ISOELÉCTRICO	
	EXPERIMENTAL	CALCULADO <sup>1/</sup>
ALBÚMINAS	2.70	2.64
GLOBULINAS	2.30	2.43
GLUTELINAS	2.50	2.62

<sup>1/</sup> Calculados a partir de ecuaciones ajustadas de regresión no lineal de la Tabla 4A.

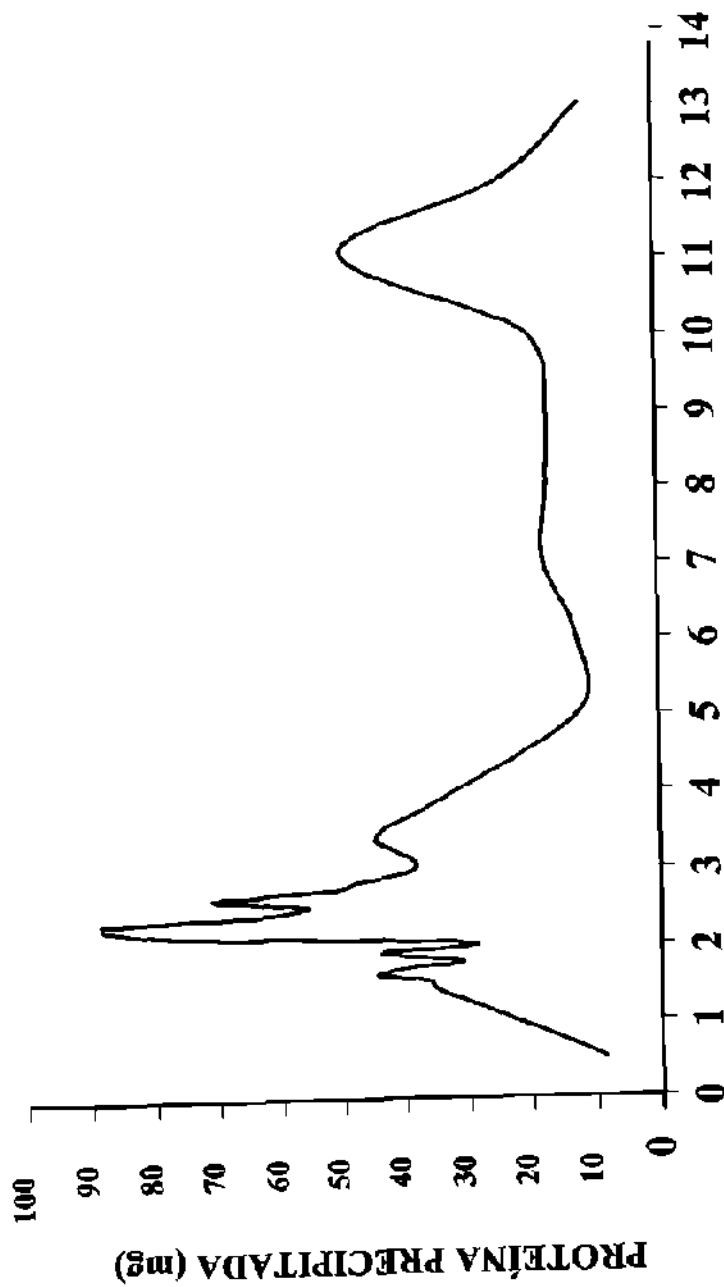
Específicamente, para las albúminas (Figura 6, Tabla 1B) los puntos de mayor precipitación proteínica se detectaron en el intervalo de pH de 2 a 4, donde precipitaron entre el 76 y 94% de la proteína; con un máximo de precipitación a pH 2.70 (93.40%), siendo éste el punto isoeléctrico de mayor precipitación encontrado experimentalmente para esta fracción proteica.

En las globulinas (Figura 7, Tabla 2B), en el intervalo de pH entre 2.10 y 2.60 precipitaron del 80 al 98% de las proteínas, con un máximo de 98.12% a pH 2.30, el cual se tomó como el punto isoeléctrico de máxima precipitación para esta fracción. En tanto que para las glutelinas, los valores de pH donde precipitaron las proteínas en mayor cantidad caen dentro del rango de pH 2.0-2.9, con una precipitación máxima (92.59%) a pH 2.50.

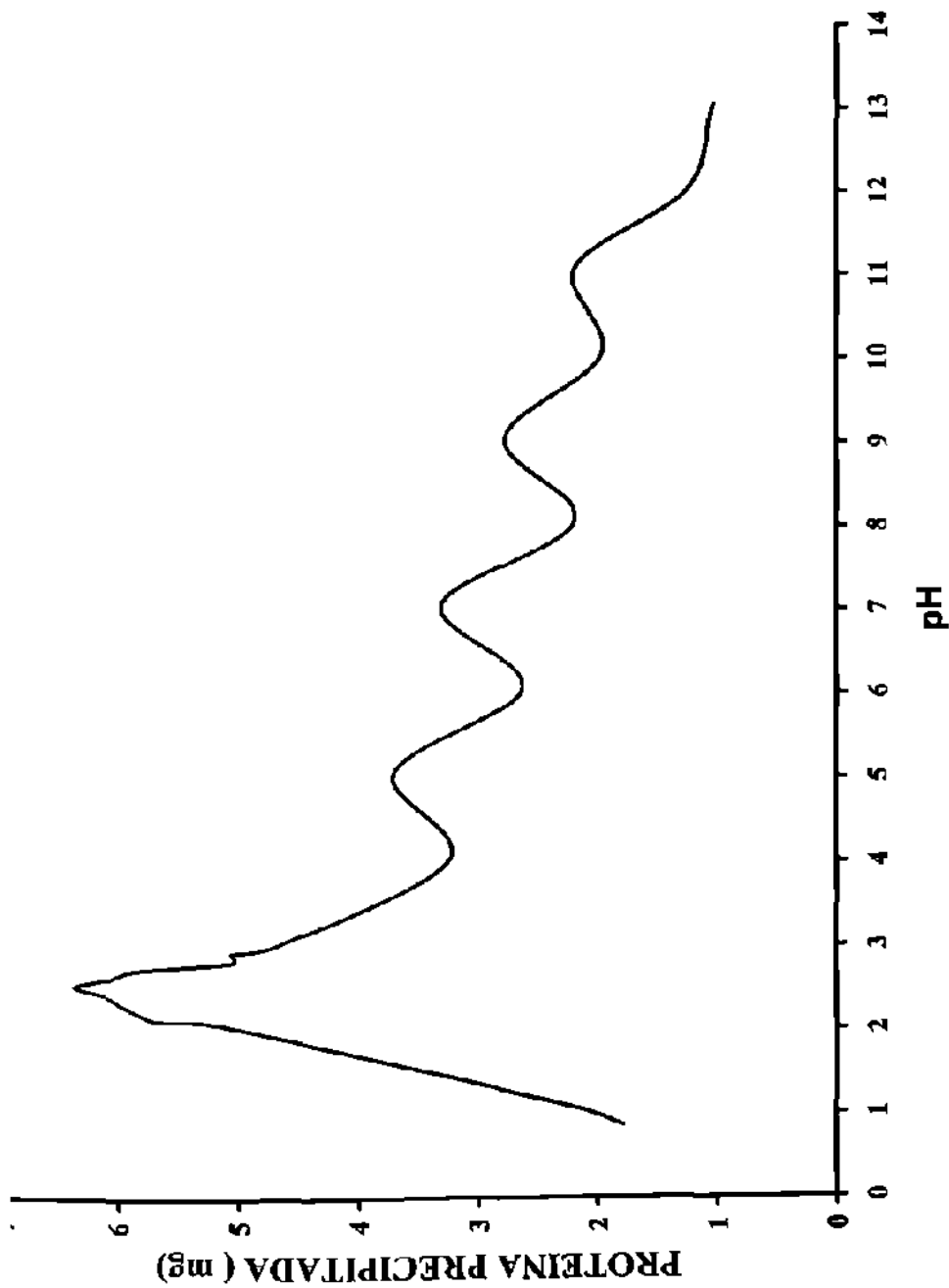
De los resultados antes expuestos se resume que los puntos isoeléctricos (PI) de precipitación máxima para las tres fracciones proteicas principales de la semilla de ébano (albúminas, globulinas y glutelinas), determinados experimentalmente, están dentro del rango de pH 2.30-2.70. Valores próximos a estos (2.0-2.5) fueron reportados por Setti y Kulkarni (1993) para los PI de las globulinas, albúminas y glutelinas de la semilla de leucaena (*Leucaena leucocephala*). Es de notar la poca información disponible en la literatura referente a la determinación de PI en fracciones proteicas de leguminosas.



**Figura 6.-** Cantidad de proteína precipitada en función del pH en la determinación de los puntos isoelectrónicos de las albuminas de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) –. Los valores son los promedios de tres determinaciones en alícuotas de 25 ml de la fracción albumínica.



**Figura 7.-** Cantidad de proteína precipitada en función del pH en la determinación de los puntos isoeléctricos de las globulinas de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -. Los valores son medias de tres determinaciones en alícuotas de 25 ml de la fracción globulínica.



**Figura 8.-** Cantidad de proteína precipitada en función del pH en la determinación de los puntos isoelectrónicos de las glutelinas de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -. Los valores son las medias de tres determinaciones en alicuotas de 25 ml de la fracción glutelínica.



El análisis de regresión no lineal aplicado a la cantidad de proteína precipitada en función del pH, en la determinación de los PI, muestra que las curvas de mejor ajuste para las tres fracciones proteicas consideradas se corresponden con funciones polinomiales complejas de 6° orden (ver Figuras 1A, 2A y 3A del apéndice A), cuyas ecuaciones pueden verse en la Tabla 3A. Dada la dificultad matemática para determinar puntos máximos mediante cálculo diferencial a partir de estas ecuaciones; optamos por aplicar el análisis de regresión no lineal considerando solamente la cantidad de proteína precipitada en el rango ácido de la escala de pH (0-7), para cada fracción. Procedimiento que se puede justificar si se toma en cuenta que las mayores precipitaciones proteicas ocurrieron en este rango. Las curvas de mejor ajuste obtenidas con éste último análisis se pueden apreciar en las Figuras 4A, 5A y 6A del apéndice A, y las correspondientes ecuaciones en la Tabla 4A. El cálculo diferencial aplicado para la determinación de puntos máximos de precipitación proteica (PI), a partir de las ecuaciones de la Tabla 4A, se expone en el apéndice A y los PI resultantes de este cálculo se muestran en la Tabla 4. La diferencia entre los PI obtenidos por cálculo diferencial y los experimentales en las tres fracciones proteicas fue, en todos los casos, menor de 0.15 unidades de pH, lo cual evidencia la bondad del ajuste de las curvas de regresión no lineal.

De especial relevancia en los resultados discutidos es el hecho de que los PI de máxima precipitación proteínica en las tres fracciones proteicas principales de la semilla de ébano se localizan en la región ácida de la escala de pH. De lo cual se infiere la abundancia de aminoácidos de naturaleza ácida en las proteínas de esta semilla. Esto se corrobora, como se verá más

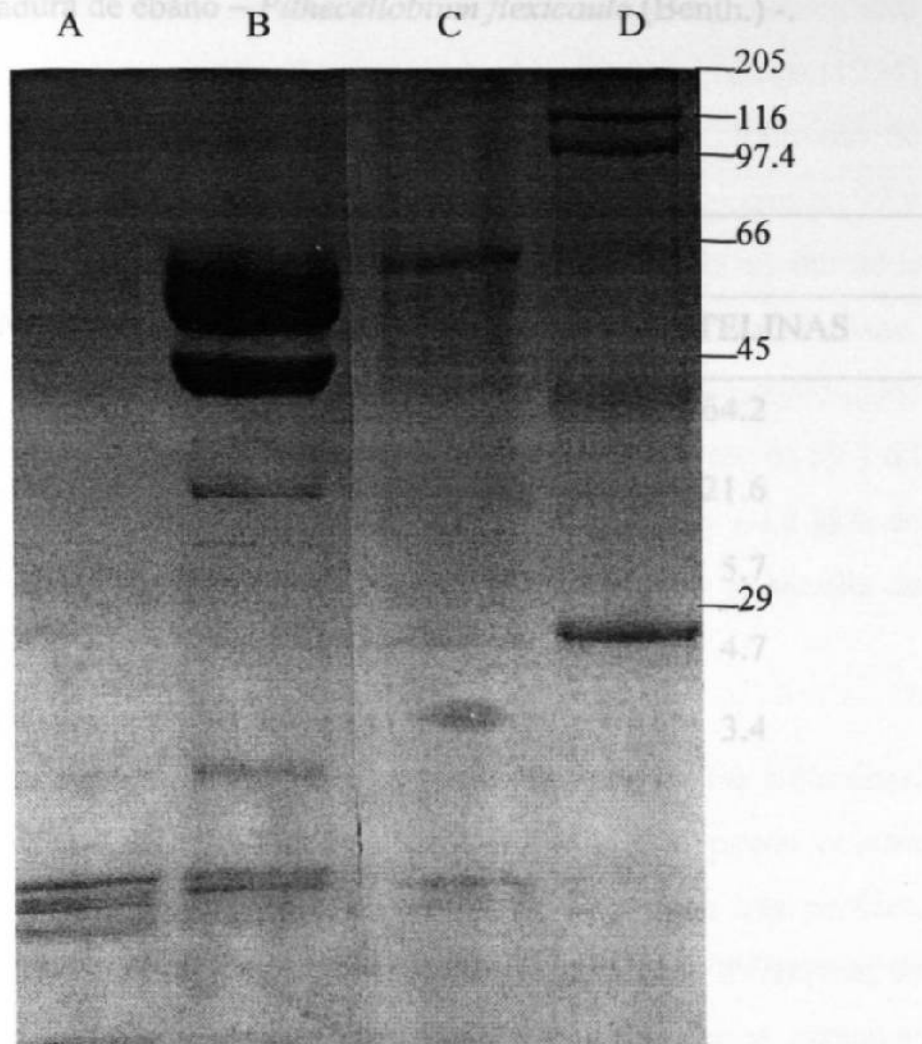
adelante, con los resultados del perfil de aminoácidos del aislado proteico obtenido.

#### **1.4.- CUANTIFICACIÓN DE PESOS MOLECULARES POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)**

El perfil electroforético (SDS-PAGE) de las albúminas, globulinas y glutelinas de la semilla de ébano se muestra en la Figura 9. Los pesos moleculares aproximados de las subunidades proteicas detectadas en esas fracciones se presentan en la Tabla 5.

La electroforesis SDS-PAGE reveló en las albúminas la existencia de 5 subunidades proteicas con pesos moleculares aparentes dentro del rango de 51.4-100.0 kDa; en las globulinas 4 subunidades con masas moleculares comprendidas entre 28.4 y 57.3 kDa, y en las glutelinas 2 subunidades con pesos moleculares de 21.6 y 64.2 kDa. Así como también se detectaron, en cada uno de los tres perfiles, péptidos con masas moleculares aparentes que van desde 1.3 hasta 12.3 kDa. La presencia de estos péptidos en las tres fracciones proteicas investigadas podría atribuirse a la hidrólisis parcial que pueden haber sufrido las proteínas durante su extracción y/o el desgrasado de la harina.

Tabla 5.- Pesos moleculares aproximados (kDa), determinados por electroforesis (SDS-PAGE), de las subunidades proteicas detectadas en las principales fracciones proteicas de la semilla madura de ébano (*Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -).



**Figura 9.-** Perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones proteicas principales de la semilla madura de ébano. Albúminas (línea A), globulinas (línea B), glutelinas (línea C), marcadores de peso molecular (línea D), las cantidades a la derecha indican el peso molecular en kDa.

**Tabla 5.-** Pesos moleculares aproximados (kDa), determinados por electroforesis (SDS-PAGE), de las subunidades proteicas detectadas en las principales fracciones proteínicas de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

PESO MOLECULAR (kDa)		
ALBÚMINAS	GLOBULINAS	GLUTELINAS
100.0	57.3	64.2
92.1	46.2	21.6
62.4	33.5	5.7
55.8	28.4	4.7
51.4	12.3	3.4
12.3	5.7	
5.7	4.7	
4.7	3.4	
3.4	1.3	
1.3		

Es de señalar que no se conocen estudios relacionados con el fraccionamiento de las proteínas de la semilla de ébano ni con el patrón electroforético de las mismas. No obstante, considerando aproximaciones, se pueden encontrar ciertas analogías con valores de pesos moleculares determinados en proteínas de otras leguminosas. Así, Chan y Phillips (1994) reportan la existencia de cuatro subunidades proteicas en las albúminas de guisantes (*Vigna unguiculata* L.), dos de ellas con pesos moleculares de 99 y 91 kDa; valores que son muy próximos a los de 100 y 92.1 kDa encontrados en dos de las subunidades proteicas de las albúminas de la semilla de ébano. Igualmente, en las globulinas y glutelinas de los guisantes, los mencionados autores encontraron subunidades proteicas con pesos moleculares de 59 y 62 kDa respectivamente, valores que son cercanos a los de 57.3 y 64.2 kDa de subunidades proteicas presentes en globulinas y glutelinas de la semilla de ébano.

Si se comparan entre sí los perfiles electroforéticos de las albúminas, globulinas y glutelinas determinados en esta investigación, puede notarse que, exceptuando la presencia común de los péptidos en los tres perfiles, ellos están compuestos por proteínas con pesos moleculares diferentes; de donde se infiere la naturaleza distintiva de las tres fracciones proteicas extraídas de la semilla de ébano. En las albúminas se encontraron las subunidades proteicas de mayor peso molecular en la semilla (92 y 100 kDa); mientras que en las globulinas se determinó la presencia abundante de proteínas con masas moleculares de 57.3 y 46.2 kDa (a juzgar por la anchura e intensidad de banda). En la fracción glutelínica se detectó la presencia de una subunidad proteica con peso molecular de 21.6 kDa, la cual podría corresponderse con inhibidores de tripsina cuya masa molecular aparente es

de 20.1 kDa (Sigma Chemical, 1984). Esta suposición es fundamentada sobre la base de que los inhibidores de tripsina (abundantes en la semilla) son solubles en NaOH diluído (De hecho, este es el solvente utilizado en la extracción de esta proteína cuando se hacen las determinaciones analíticas del inhibidor, Kakade *et al.*, 1974).

## 2.- CONDICIONES ÓPTIMAS DE pH Y TEMPERATURA PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA SEMILLA DE ÉBANO

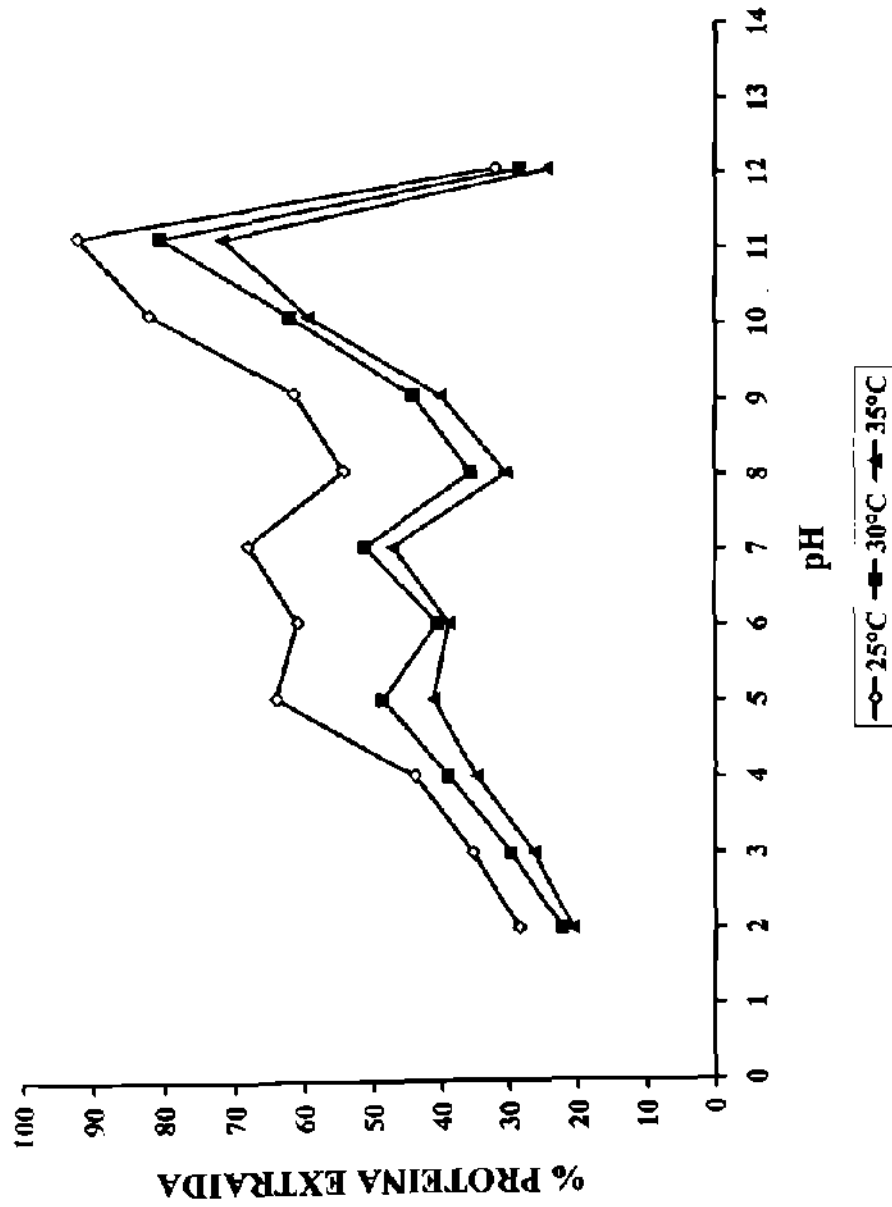
Las cantidades de proteína extraídas de la harina desgrasada de la semilla madura de ébano a los diferentes valores de pH y temperatura ensayados, para determinar las condiciones de máxima extracción proteica, se muestran en la Tabla 6 y se representan graficamente en la Figura 10.

Los valores F, calculados mediante el análisis de varianza de dos factores (pH y temperatura) aplicado a los resultados antes señalados, se presentan en la Tabla 5A del apéndice A. Como se puede apreciar en esta tabla, al considerar al factor pH en conjunto con el factor temperatura, las diferencias observadas en los contenidos de proteína extraída resultaron altamente significativas ( $P < 0.01$ ), tanto para cada factor como para la interacción de ambos. De lo cual se evidencia que la extractabilidad de

**Tabla 6.-** Cantidad de proteína extraída (%) de la semilla madura de ébano - *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) - a diferentes valores de pH y temperatura.

pH	PROTEÍNA EXTRAÍDA (%) <sup>I/</sup>		
	25°C	30°C	35°C
2	28.63 ± 1.00	22.38 ± 0.90	20.83 ± 0.37
3	35.42 ± 0.82	29.85 ± 0.72	26.45 ± 0.69
4	44.06 ± 0.13	39.13 ± 0.80	34.96 ± 0.60
5	64.20 ± 1.61	48.70 ± 0.95	41.26 ± 0.24
6	61.21 ± 0.62	40.78 ± 0.64	39.10 ± 0.97
7	68.37 ± 0.50	51.41 ± 1.29	47.33 ± 0.52
8	54.48 ± 0.34	35.93 ± 0.11	30.73 ± 0.93
9	61.74 ± 0.60	44.46 ± 0.56	40.43 ± 0.55
10	82.35 ± 0.73	62.34 ± 1.16	59.58 ± 0.33
11	92.54 ± 1.78	80.90 ± 0.49	72.11 ± 0.73
12	32.15 ± 0.98	28.62 ± 1.08	24.58 ± 0.82

<sup>I/</sup> Valores promedios de tres determinaciones ± desviación estándar.



**Figura 10.-** Cantidad de proteína extraída de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – a diferentes valores de pH y temperatura. Los valores son medias de tres determinaciones.



proteínas en la semilla madura de ébano es dependiente tanto del pH como de la temperatura.

Al evaluar por separado al factor pH, mediante la aplicación de un ANOVA de una sola vía, los valores F obtenidos (mostrados en la Tabla 6A del apéndice A) también resultaron altamente significativos ( $P < 0.01$ ) en cada una de las tres temperaturas estudiadas. Las comparaciones múltiples de medias (Tukey), sobre la base de este ANOVA, confirman que existen diferencias entre las cantidades de proteína extraídas a los valores de pH considerados en las tres temperaturas (ver Tabla 6A), excepto las extraídas a pH 6 y 9 a 25°C, a pH 3 y 12 a 30°C y a pH 5, 6 y 9 a 35°C, las cuales son homogéneas. De estos resultados se puede inferir que la extracción de proteínas fue altamente dependiente del pH.

La comparación entre las cantidades de proteína extraídas a las tres temperaturas investigadas, pone de manifiesto que, para cada valor del pH, la extracción fue mayor a 25°C que a 30°C, y a esta última temperatura a su vez fue más alta que a 35°C. Esto podría atribuirse al grado de desnaturalización proteica el cual tiende a incrementarse con la temperatura, determinando consecutivamente un decrecimiento progresivo en la solubilidad de la proteína.

En las curvas graficadas en la Figura 10 se puede observar, para las tres temperaturas ensayadas, un patrón común de distribución de los valores correspondientes a las cantidades extraídas de proteína a lo largo de la escala de pH. Así, a cada temperatura la extracción proteica fue mayor en el rango alcalino, aumentando gradualmente desde pH 8 hasta un máximo a pH 11.

Esto puede ser consecuencia de procesos disociativos en las proteínas, originados por repulsión de cargas eléctricas, despliegues o desdoblamiento de moléculas, etc.; que ocurren a esos valores de pH y que favorecen la interacción proteína-solvente en lugar de la proteína-proteína, incrementando de esta manera la solubilidad proteica. En el rango ácido las extracciones más altas ocurrieron a pH 5 y las más bajas a pH 2 y 3, o sea en los alrededores de los puntos isoelectricos máximos encontrados para las tres fracciones proteicas principales de la semilla de ébano.

Es de hacer notar la concordancia entre estos resultados y los encontrados en la determinación de los puntos isoelectricos de las albúminas, globulinas y glutelinas de esta semilla. Si se comparan las gráficas de la Figura 10 con las mostradas en las Figuras 6, 7 y 8, puede observarse, que por lo general, valores altos de precipitación proteica en las tres fracciones se corresponden con valores bajos de cantidades de proteína extraída y viceversa, siendo esto más relevante en las albúminas las cuales son las proteínas más abundantes en las semillas de ésta leguminosa.

De los resultados expuestos en la Tabla 6 y Figura 10 se concluye que las condiciones óptimas de pH y temperatura para la extracción máxima de proteínas en la semilla de ébano son pH 11 y 25°C, condiciones éstas bajo las cuales se extrajo alrededor del 92% de las proteínas de la semilla.

Es importante señalar que aparte del desconocimiento de estudios de esta naturaleza que se hayan realizado con proteínas de semillas de ébano, es muy poca la información encontrada en la literatura respecto a la determinación de condiciones operacionales para la máxima extracción de

proteínas en otras leguminosas. Bello y Okezie (1989) investigaron el efecto de varios parámetros, entre ellos: pH (2-12), temperatura (15°, 30° y 45°C), tiempo de extracción, relación harina-solvente, etc.; para determinar las condiciones de mayor extracción proteica en frijoles alados (*Psophocarpus tetragonolobus* DC), reportando que la extracción de proteína fue máxima a pH 12 y 30°C; indicando además que el pH fue la variable más influyente en la extracción y que ésta no se vió afectada significativamente por las diferentes temperaturas utilizadas. Sin embargo, no podemos comparar nuestros resultados con los reportados por los autores mencionados por tratarse de leguminosas diferentes; puesto que los valores a los cuales se deben operar las diferentes variables para la óptima extracción de proteínas, son característicos para cada especie de leguminosa, por estar en función de la naturaleza de las proteínas y de la composición de la semilla.

En las Figuras 7A, 8A y 9A del apéndice A se muestran las curvas de mejor ajuste, obtenidas mediante el análisis de regresión no lineal entre el pH y la cantidad de proteína extraída, para cada temperatura ensayada. En la Tabla 7A se presentan las correspondientes ecuaciones ajustadas de regresión y los coeficientes de determinación. Los altos valores obtenidos para estos últimos, evidencian la exactitud con la cual el plano de regresión se ajusta a los puntos experimentales observados; razón por la cual se pueden utilizar dichas ecuaciones para predecir la cantidad de proteína extraída de la harina desgrasada en función del pH.

### 3.- COMPOSICIÓN Y RENDIMIENTO DEL AISLADO PROTEICO OBTENIDO

En la Tabla 7 se muestra la composición proximal del aislado proteico de la semilla madura de ébano. Si se comparan estos valores con la composición de la harina desgrasada (materia prima para el aislado) presentada en la Tabla 1, puede notarse en el aislado una disminución en los contenidos de grasa, fibra, cenizas y carbohidratos (extracto libre de nitrógeno), en relación a la harina. Este decrecimiento podría explicarse sobre la base de la solubilidad de los componentes no proteicos en la semilla. Así, es de considerar que los compuestos insolubles permanecieron en el residuo durante la extracción de proteínas (realizado a pH 11 y 25°C); mientras que los solubilizados en esas condiciones, en su mayor parte, no precipitaron junto a la proteína durante la precipitación isoelectrica (pH 2.6), quedando por consiguiente en el sobrenadante. En el caso de las cenizas, la disminución podría atribuirse además a la lixiviación de minerales por el lavado realizado en el aislado.

Por otra parte, aquellos constituyentes no proteicos que precipitaron como impurezas con las proteínas en la obtención del aislado, podrían ser residuos de fosfolípidos, glucósidos, pectinas u otros polisacáridos estructurales (componentes de la fibra cruda), etc., que de alguna manera estaban asociados, conjugados o formando complejos con las proteínas en las semillas o que se asociaron a ella durante las diferentes etapas del procesamiento en la obtención del aislado. Nash y Wolf, citados por Badui

**Tabla 7.- Composición proximal<sup>1/</sup> del aislado proteico obtenido de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.**

COMPONENTE	% <sup>1/</sup>
PROTEÍNA (N x 6.25)	89.98 ± 0.41
GRASA	0.35 ± 0.01
FIBRA	1.69 ± 0.04
CENIZAS	1.23 ± 0.03
HUMEDAD	4.46 ± 0.07
EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO <sup>2/</sup>	6.75 ± 0.37

<sup>1/</sup> Valores promedios de tres determinaciones ± desviación estándar, en base seca.

<sup>2/</sup> Obtenido por diferencia.

(1993) mencionan que los aislados proteicos de leguminosas, por lo general, contienen ciertos compuestos de bajo peso molecular como fosfolípidos, isoflavonas, saponinas o algunos otros glucósidos. Qi *et al.*, (1977), obtuvieron un aislado proteico de soya por precipitación isoeléctrica, reportando contenidos de proteína, grasa, fibra, cenizas y carbohidratos del orden de 92, 0.14, 1.2, 1.1 y 5.56%, en base seca, respectivamente. Wang y Zayas, (1992) reportaron la obtención de un aislado proteico de soya con

83.69% de proteínas, 0.98% de grasa, 4.12% de cenizas y 6.41% de carbohidratos. Puppo *et al.*, (1995); Chen y Morr, (1985); Boatright y Hettiarachchy, (1995); obtuvieron aislados proteicos de soya con 82.4, 74.7 y 83.2% de proteínas respectivamente. Estos y otros resultados encontrados en la literatura para aislados proteicos de soya evidencian que, incluso de una misma leguminosa, es posible obtener aislados con contenidos variables de sus componentes.

De lo antes expuesto se puede inferir que la composición cuantitativa de los aislados proteicos está en función de las condiciones experimentales que se manejen en el proceso de obtención de los mismos.

El contenido de proteínas del aislado obtenido de la semilla de ébano (89.98%) es comparable al de los aislados proteicos de soya antes mencionados, así como al de varios aislados de otras leguminosas; entre ellos: el de frijoles adzuki (89.90%, Tjahjadi *et al.*, 1988), frijoles Gran Norteño (92.4%, Sathe y Salunkhe, 1981), garbanzos (84.8%, Paredes-López *et al.*, 1991), habas (86.3%, Sosulski y McCurdy, 1987), frijoles alados (89.8%, Okezie y Bello, 1988), etc.

Respecto al rendimiento del proceso, el aislado proteico obtenido de la semilla de ébano representa un 22.8% del material de partida (harina desgrasada), en base al peso de la materia seca, y un 45.6% en base al total de proteínas de la semilla. King *et al.*, (1985), obtuvieron un aislado proteico de semillas de *Lupinus* con un rendimiento del 25.2% en relación a la harina desgrasada y 55.4% de la proteína original. Swamylingappa y Srinivas, (1994) reportan rendimiento del 58 y 54% (en base al contenido proteico)

para aislados de soya obtenidos a 28°C y 58°C respectivamente. En aislados proteicos de frijoles alados Sathe *et al.*, (1982) lograron rendimientos de alrededor del 38% del material de partida (semilla entera) y del 67.9% de la proteína recuperada; mientras que Tjahjadi *et al.*, (1988) refieren una recuperación de proteínas de apenas el 17.6% en frijoles adzuki. Como puede verse en esos resultados, también hay variaciones en los rendimientos logrados en el proceso de obtención de los aislados proteicos de leguminosas, puesto que estos dependen tanto de la composición de la semilla como de las condiciones experimentales del proceso.

En relación a nuestros resultados, es posible que la variabilidad de puntos isoeléctricos encontrados en las fracciones proteicas principales de la semilla (Figuras 6, 7 y 8) haya influido en el rendimiento obtenido. Puesto que la precipitación de proteínas se efectuó a un valor determinado de pH (2.6), es probable que hayan quedado sin precipitar proteínas de las diferentes fracciones cuyos puntos isoeléctricos están fuera del pH de precipitación usado.

También existe la probabilidad de que la combinación de extractantes utilizados en la solubilización de proteínas pueda haber afectado al rendimiento. Con el propósito de obtener un aislado proteico que estuviera compuesto por la mayor cantidad posible de cada una de las principales proteínas de la semilla, utilizamos en la extracción: agua desionizada (para extraer las albúminas) y solución de NaCl al 5% (para la solubilización de globulinas). En investigaciones realizadas por Liadakis *et al.*, (1998) para la optimización de condiciones en la obtención de un aislado proteico de semillas de tomate, utilizaron agua y solución de NaCl, entre otros solventes,

para extraer las proteínas. Sus resultados revelan que con la solución de NaCl obtuvieron un aislado de mayor contenido proteico (90.6%) que el obtenido con el agua (71.3%), pero de un rendimiento inferior (20.2%) que el conseguido con este último extractante (41.2%).

Aunque el pH del medio, al cual ocurre la extracción y precipitación de proteínas, es la variable de mayor peso a considerar en el proceso del aislamiento proteico, no es de descartar la influencia que pueda tener el extractante en el rendimiento. Así, en concordancia con los resultados de la investigación antes mencionada, cabe señalar que si bien, el uso de NaCl al 5% pudo hacer selectiva la solubilización de globulinas, aumentando el contenido de proteínas extraídas, también es probable que pueda haber afectado la solubilidad de las albúminas en detrimento del rendimiento global del proceso.

#### **4.- VALORACIÓN NUTRICIONAL DEL AISLADO PROTEICO**

##### **4.1.- COMPUESTOS ANTINUTRICIONALES**

Los contenidos de taninos, fitatos y la actividad de los inhibidores de tripsina determinados en el aislado proteico de la semilla madura de ébano se presentan en la Tabla 8.



**Tabla 8.-** Contenido de taninos, fitatos y actividad de inhibidores de tripsina en el aislado proteico obtenido de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

PARÁMETRO	CANTIDAD <sup>1/</sup>
TANINOS (mg equiv. catequina/100 g muestra)	16.35 ± 0.94
FITATOS (mg ácido fítico/g muestra)	18.66 ± 0.31
ACTIVIDAD DE INHIBIDORES DE TRIPSINA (UIT/mg muestra)	139.44 ± 0.57

<sup>1/</sup> Los valores son las medias de tres replicaciones ± desviación estándar, en base seca.

En la evaluación nutricional de la semilla de ébano realizada por nosotros (González-Quijada, 1996), base preliminar del presente estudio, se determinaron en la harina (sin desgrasar) de la semilla madura, en promedio, contenidos de taninos del orden de 14.25 mg equiv. catequina/100 g muestra, 26.69 mg ácido fítico/g muestra de fitatos y 227.02 UIT/mg muestra para la actividad de los inhibidores de tripsina, en base seca.

Es de hacer notar que la harina de la semilla madura de ébano (sin desgrasar) contiene 36.81% de proteína en base seca, mientras que el contenido proteico del aislado obtenido en esta investigación es de 89.98%. Por consiguiente, con propósitos comparativos, los resultados del análisis de

antinutricionales, tanto en el aislado como en la harina, se expresaron en función del contenido de proteínas de ambos productos. La comparación de resultados, sobre esta base, se muestra en la Tabla 9, junto con el porcentaje de reducción de estos compuestos antinutricionales. Este proceder se podría justificar, si se toma en cuenta que los inhibidores de tripsina son proteínas y, por otra parte, los fitatos y taninos forman complejos con proteínas a través de iones metálicos enlazantes como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ , etc. (Reddy y Pierson, 1987; Proulx *et al.*, 1993).

Como se puede apreciar en la Tabla 9, el proceso de obtención del aislado proteico redujo el contenido de taninos en un 53% y los fitatos y la actividad de los inhibidores de tripsina en más del 70%. Estas reducciones podrían atribuirse a los cambios de solubilidades de estos compuestos por efectos de los valores del pH manejados durante la extracción y precipitación de proteínas; y en parte también a la naturaleza de los solventes utilizados en el proceso.

Reddy y Salunkhe (1981) mencionan que la extracción de fitatos de cualquier semilla o material alimenticio depende de varios factores, entre ellos: a) asociación de fitatos con otros componentes (proteínas, cationes mono, di y trivalentes), b) pH del medio, c) el tipo de solvente y la fuerza iónica utilizada, d) presencia de hierro endógeno. Saeed y Cheryan (1988) determinaron el perfil de solubilidad de los fitatos en el rango de pH 2-12. En ese perfil se observa que a pH 11 la solubilidad de los fitatos es muy baja (menor del 20%), mientras que a pH 2.5-3.0 alcanza un valor cercano al 40%. Cotejando estos resultados con los valores de pH usados en la obtención del aislado proteico, podemos inferir que al pH de extracción de

las proteínas (pH 11) sería muy poca la cantidad de fitato solubilizada; por otra parte, es probable que no todo el fitato solubilizado haya precipitado junto a la proteína si se considera la solubilidad de ese compuesto al pH isoelectrico de precipitación proteica (2.6).

**Tabla 9.-** Contenido<sup>1/</sup> de taninos, fitatos y actividad de inhibidores de tripsina del aislado proteico de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – comparados con los de la harina sin desgrasar de la misma semilla.

PARÁMETRO	HARINA <sup>2/</sup> SIN DESGRASAR	AISLADO PROTEICO	% REDUCCIÓN
TANINOS (mg equiv. catequina/100 g proteína)	38.71	18.17	53.06
FITATOS (mg ácido fitico/g proteína)	72.51	20.73	71.41
ACTIVIDAD DE INHIBIDORES DE TRIPSINA (UIT/mg proteína)	616.73	154.97	74.87

<sup>1/</sup> Valores expresados en función del contenido proteico, en base seca, de ambos productos.

<sup>2/</sup> Fuente: González-Quijada, 1996.

A la diferencia de solubilidades por medio del pH también podría deberse la reducción de taninos, aunado al efecto de la solución salina utilizada en la extracción de las proteínas. Price y Butler, citados por Desphande y Cheryan (1987), refieren que las soluciones salinas reducen la solubilidad de los taninos condensados. Estos autores extrajeron taninos de 10 variedades de frijoles (*Phaseolus vulgaris*) empleando agua y solución de NaCl 1 M como extractantes (midiendo sus contenidos por el ensayo de azul de Prussia), reportando que en todas las variedades la cantidad de taninos extraída con NaCl 1 M fue siempre mucho menor. El uso de la solución de NaCl al 5% como extractante de proteínas en la semilla de ébano, puede haber disminuído la cantidad de taninos en solución. No obstante, el pH del medio parece ser el factor determinante en esta reducción. Saeed y Cheryan (1988) señalan que el medio ácido incrementa la solubilidad de los polifenoles, minimizando la interacción proteína-polifenol (en efecto, varios de los métodos de extracción de taninos emplean alcoholes acidificados con HCl). De acuerdo a esto, es posible que mucho de los taninos solubilizados permanecieran en el sobrenadante durante la precipitación proteica a pH 2.6.

La reducción de la actividad de los inhibidores de tripsina en el aislado proteico, comparada con la determinada en la harina de partida, podría atribuirse al efecto conjunto de varios factores, entre los cuales cabe mencionar: El tratamiento térmico y la agitación mecánica durante el desgrasado de la harina. Los inhibidores de tripsina son proteínas que pueden desnaturalizarse por acción del calor y del movimiento; causando la inactividad parcial o total del inhibidor. Está bien comprobado el carácter termolábil de estos inhibidores (Barampana y Simard, 1994; Durandhar y Chang, 1990; Henn y Netto, 1998; Sathe *et al.*, 1982) y en particular los de

la semilla madura de ébano, donde por el tostado de la semilla la actividad de los inhibidores de tripsina disminuyó en más del 90% (González-Quijada, 1996). Aunque en el desgrasado de la harina no se emplearon altas temperaturas (las temperaturas de extracción de grasa estuvieron dentro del intervalo 35°-37°C), por el tiempo (6 horas) y la agitación durante este calentamiento pudieron haberse inactivado porciones de estos inhibidores. El pH y la naturaleza de la solución extractante, son otros factores a tomar en cuenta en ésta reducción. Honig *et al.*, citados por Henn y Netto (1998), indican que el contenido y la actividad de los inhibidores de tripsina durante la obtención de los aislados es afectada por la extracción de las proteínas con soluciones salinas y por el pH usado para la precipitación. Estos últimos investigadores determinaron la actividad de inhibidores de tripsina en trece aislados proteicos de soyas comerciales, reportando que los diferentes aislados presentaron actividades antitripticas que variaron desde 5.17 hasta 94.72 UIT/mg proteína; mencionando que esta variación es posiblemente debida a las diferencias en el tratamiento térmico recibido por cada producto. Swamlingappa y Srinivas (1994) desgrasaron harina de soya con hexano a 28°C para producir un aislado proteico de esa leguminosa, informando que la actividad de los inhibidores de tripsina disminuyó desde 138 UIT/mg proteína en la harina hasta 52 UIT/mg proteína en el aislado.

En relación con el contenido de fitatos del aislado proteico de la semilla de ébano, es de señalar que este resultado es concordante con el encontrado por Chen y Morr (1985) en un aislado proteico de soya (19.0 mg equiv. catequina/100 g muestra) y por Naczki *et al.* (1986) en aislados proteicos de chícharos (20.0 mg equiv. catequina/100 g muestra). No se

encontraron en la literatura reportes para el contenido de taninos en aislados proteicos de leguminosas.

#### **4.2.- COMPOSICIÓN AMINOÁCIDA**

La composición aminoacídica del aislado proteico de la semilla madura de ébano es reportada en la Tabla 10.

Los resultados indican que los aminoácidos esenciales lisina, leucina, fenilalanina, tirosina y treonina están presentes en cantidades relativamente altas en el aislado proteico estudiado (en relación a la semilla de la cual se obtuvo), mientras que los azufrados (metionina+cistina) y la isoleucina se encuentran en niveles bajos. Una tendencia similar a la descrita ha sido encontrada en aislados proteicos de soya, garbanzos, chícharos, habas, frijoles alados (Henn y Netto, 1998; Paredes-López *et al.*, 1991; Sosulski y McCurdy, 1987; Okezie y Bello, 1988).

Si se compara el perfil de aminoácidos del aislado proteico de la semilla madura de ébano con el de los cotiledones de la misma semilla (González-Quijada, 1996), como se muestra en la Tabla 11, se puede apreciar que el aislamiento de las proteínas produjo una reducción en los niveles de algunos aminoácidos (isoleucina, metionina, cistina, valina, glicina, alanina y ácidos glutámico y aspártico) y un aumento en el contenido de otros (resto de los aminoácidos determinados). Resultados análogos a estos fueron reportados por Okezie y Bello (1988) y por Tjahjadi

**Tabla 10.-** Composición aminoácida del aislado proteico obtenido de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

AMINOÁCIDO	gramo de aminoácido/100 gramos de proteína (16 gN) <sup>U</sup>
<u>ESENCIAL</u>	
ISOLEUCINA	2.56
LEUCINA	8.16
LISINA	7.52
METIONINA	0.66
CISTINA	0.63
FENILALANINA	5.91
TIROSINA	5.11
TREONINA	5.24
TRIPTOFANO	1.12
VALINA	3.52
HISTIDINA	2.81
<u>NO ESENCIAL</u>	
ÁCIDO ASPÁRTICO	4.96
SERINA	4.80
ÁCIDO GLUTÁMICO	10.93
PROLINA	4.94
GLICINA+ALANINA	5.25
ARGININA	7.37

<sup>U</sup> El análisis se hizo por duplicado. Los valores son las medias de ambas replicaciones.

*et al.* (1988) en aislados proteicos de frijoles alados y de frijoles adzuki respectivamente.

Estos cambios en los contenidos de aminoácidos podrían estar relacionados con múltiples factores, entre ellos: naturaleza de las distintas fracciones proteicas que componen la semilla, procesos de extracción y precipitación de proteínas y, en cierto grado también, de la propia determinación analítica de los aminoácidos. Con respecto a las fracciones proteicas, es de mencionar que investigaciones realizadas por Sauvaire *et al.* (1984) en proteínas de fenogreco, por Chan y Phillips (1994) en guisantes y por Tjahjadi *et al.* (1988) en proteínas de frijoles adzuki; en las cuales se determinaron los perfiles de aminoácidos de las albúminas, globulinas y glutelinas de esas semillas, revelan que la relación cuantitativa de aminoácidos es diferente en las distintas fracciones proteicas estudiadas

Aunque no se determinaron los perfiles de aminoácidos de las fracciones proteicas de la semilla de ébano, cabe esperar que entre ellas también existan diferencias en cuanto a sus contenidos de aminoácidos, siendo algunas más ricas en cierto tipo de aminoácidos que otras. Si esto lo asociamos con la eficiencia del proceso de extracción de proteínas, donde quedó un residuo de alrededor del 8% de proteínas no solubilizadas, y con la precipitación isoeléctrica, en la cual es evidente (por el rendimiento obtenido) que permanecieran sin precipitar cantidades considerables de la proteína extraída; es posible argumentar que tanto en el residuo insoluble de la extracción como en la solución después de la precipitación hayan quedado proteínas de las distintas fracciones que, por su relación de aminoácidos, puedan haber contribuido al desbalance encontrado entre los aminoácidos del aislado y los de la semilla completa; determinando en el aislado el



**Tabla 11.-** Composición aminoácida del aislado proteico de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – comparada con la de los cotiledones de la misma semilla.

AMINOÁCIDO	g/100 g proteína (16 gN)	
	AISLADO PROTEICO	COTILEDONES <sup>U</sup>
<u>ESENCIAL</u>		
ISOLEUCINA	2.56	3.43
LEUCINA	8.16	6.78
LISINA	7.52	6.22
METIONINA	0.66	0.76
CISTINA	0.63	0.65
FENILALANINA	5.91	1.32
TIROSINA	5.11	4.15
TREONINA	5.24	2.81
TRIPTOFANO	1.12	0.71
VALINA	3.52	5.15
HISTIDINA	2.81	1.67
<u>NO ESENCIAL</u>		
ÁCIDO ASPÁRTICO	4.96	8.19
SERINA	4.80	3.53
ÁCIDO GLUTÁMICO	10.93	14.79
PROLINA	4.94	4.06
GLICINA+ALANINA	5.25	7.77
ARGININA	7.37	4.28

<sup>U</sup> Fuente: González-Quijada (1996).

decrecimiento observado en los contenidos de algunos de ellos. Por otra parte, si se considera que el aislado es de una pureza proteica mucho más alta que la de la semilla completa, se puede inferir que su proteína está más accesible a la hidrólisis (realizada previa a la determinación de aminoácidos) que la de esta última y en consecuencia la extensión de la hidrólisis en el aislado pudo haber sido mayor, lo cual podría haber influido también en el resultado observado.

En la Tabla 12 se presenta la distribución de aminoácidos esenciales del aislado proteico obtenido de la semilla de ébano, en comparación con la de aislados de algunas leguminosas tradicionalmente comestibles. Como se puede notar en la mencionada tabla, a excepción de los aminoácidos isoleucina, valina y de los azufrados metionina y cistina los cuales se encontraron en cantidades un poco más bajas en el aislado proteico de la semilla de ébano, la composición de aminoácidos esenciales de este aislado se compara favorablemente con el de las otras leguminosas allí mostradas. Así, los contenidos de lisina, fenilalanina, tirosina, treonina e histidina del aislado de la semilla de ébano son más altos que el de los otros referidos. El contenido de leucina es muy similar en los cinco aislados tabulados y el del triptofano, aunque ligeramente inferior que el del aislado de soya obtenido por Sosulski y McCurdy (1987), es más elevado que el determinado por Henn y Netto (1998) en el aislado de soya comercial Supro 500E.

De relevante importancia en la composición aminoácida del aislado proteico de la semilla de ébano son sus contenidos relativamente altos de lisina y treonina, ya que estos aminoácidos son, por lo general, el primero y segundo aminoácido limitante, respectivamente, en semillas de cereales, con los cuales podrá complementarse efectivamente.

**Tabla 12.-** Contenido de aminoácidos esenciales del aislado proteico de la semilla de ébano - *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) - comparado con los de aislados proteicos de otras leguminosas.

AMINOÁCIDO ESENCIAL (g/100 g proteína)	AISLADO PROTEICO				
	ÉBANO	SOYA <sup>1/</sup>	GARBANZOS <sup>2/</sup>	CHÍCHAROS <sup>3/</sup>	SOYA (Supro 500E) <sup>3/</sup>
ISOLEUCINA	2.56	4.80	4.00	4.60	4.90
LEUCINA	8.16	8.10	8.00	8.50	8.17
LISINA	7.52	6.30	6.80	7.20	5.51
METIONINA	0.66	1.50	1.90	0.90	0.91
CISTINA	0.63	1.10	2.20	1.00	0.89
FENILALANINA	5.91	5.00	4.70	5.20	4.74
TIROSINA	5.11	4.10	2.60	3.40	3.14
TREONINA	5.24	4.10	3.10	3.30	4.54
TRIPTOFANO	1.12	1.40	ND <sup>4</sup>	1.10	0.83
VALINA	3.52	5.10	3.90	5.00	5.19
HISTIDINA	2.81	2.30	2.40	2.60	2.30

<sup>1/</sup> Sosulski y McCurdy (1987).

<sup>2/</sup> Paredes-López *et al.* (1991).

<sup>3/</sup> Henn y Netto (1998).

<sup>4</sup> No determinado.

#### 4.3.- DIGESTIBILIDAD VERDADERA DE LA PROTEÍNA

En la Tabla 13 se puede observar el valor obtenido para la digestibilidad verdadera de la proteína del aislado de la semilla de ébano. Este resultado es promedio de ocho determinaciones realizadas mediante un ensayo *in vivo* con ratas de la raza Sprague-Dawley. El coeficiente de variación de estas determinaciones es 6.2%. La variabilidad entre las observaciones es causada presumiblemente por factores inherentes a la técnica metodológica utilizada (Joint FAO/WHO Expert Consultation, 1989), entre los cuales se incluyen las variaciones atribuibles al metabolismo individual de los animales usados en el bioensayo.

Tabla 13.- Digestibilidad verdadera promedio<sup>1/</sup> de la proteína del aislado obtenido de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – comparada con la de la proteína de la semilla completa de la misma leguminosa.

MATERIAL	DIGESTIBILIDAD VERDADERA (%)
AISLADO PROTEICO	85.36 ± 5.33
SEMILLA COMPLETA <sup>2/</sup>	79.31 ± 3.63

<sup>1/</sup> Valores promedio de 8 determinaciones, en ratas de la raza Sprague-Dawley, ± desviación estándar.

<sup>2/</sup> Fuente: González Quijada, (1996).

Si se compara este resultado con el valor de la digestibilidad verdadera de la proteína de la semilla completa, determinada previamente por nosotros (González Quijada, 1996), como se muestra en la Tabla 13; se puede notar que la digestibilidad de la proteína de la semilla de ébano se incrementó en aproximadamente un 6% con el proceso de aislamiento proteico realizado. Este aumento en la digestibilidad podría ser atribuido a la reducción de compuestos antinutricionales (taninos, fitatos e inhibidores de tripsina) que ocurrió durante el proceso de obtención del aislado proteico (ver Tabla 9).

Los taninos y fitatos forman complejos insolubles con las proteínas, reduciendo su valor biológico (Aw y Swanson, 1985; Gustafsson y Sandberg, 1995), además se ha comprobado que los fitatos pueden inhibir a enzimas como pepsina, alfa-amilasa y tripsina bajo condiciones *in vitro* (Reddy *et al.*, 1988). Por otra parte, los inhibidores de tripsina son proteínas que interactúan estequiométricamente con la tripsina (enzima proteolítica secretada por el páncreas) neutralizándola; cuando esto ocurre las proteínas no son digeridas adecuadamente y en consecuencia disminuye la absorción de aminoácidos en el organismo (Wang *et al.*, 1998). A la disminución de estos factores antinutricionales en el aislado proteico, aunado a la probable desnaturalización parcial de las proteínas del aislado (en mayor grado que la de la semilla completa) podría deberse el incremento observado en la digestibilidad de las proteínas de esta semilla.

Es oportuno señalar que en la literatura consultada se encontró poca información referente a la digestibilidad de aislados proteicos de

leguminosas, aunque si se reportan digestibilidades *in vitro* de proteínas de semillas de leguminosas en estado crudo o tratadas térmicamente.

En la Tabla 14 se han recopilado los valores de la digestibilidad *in vitro* de algunos concentrados proteicos y de la proteína de semillas completas de varias leguminosas, relacionándolos con la del aislado proteico investigado en este estudio.

Como se puede observar en dicha tabla, la digestibilidad del aislado proteico de la semilla de ébano es ligeramente inferior que la del aislado proteico de soya referido, sin embargo, debemos tener en cuenta que ambas fueron obtenidas por metodologías diferentes. La del aislado de la semilla de ébano fue determinada mediante un ensayo *in vivo*, por lo cual es la digestibilidad verdadera de esa proteína, mientras que la otra se obtuvo mediante un ensayo químico *in vitro* con el uso de enzimas. Puede notarse también, en la misma tabla, que la digestibilidad de la proteína del aislado que procesamos es más alta que la de los concentrados proteicos y demás leguminosas allí tabuladas.

#### **4.4.- PUNTAJE AMINOACÍDICO Y CALIDAD DE LA PROTEÍNA**

La razón entre los aminoácidos esenciales del aislado proteico de la semilla de ébano y los del patrón de referencia de la FAO/OMS/UNU (Tabla 4B del apéndice B) se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 14.-** Digestibilidad de la proteína del aislado de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – en relación con la de materiales proteicos de otras leguminosas.

MATERIAL	DIGESTIBILIDAD (%)
AISLADO PROTEICO DE ÉBANO	85.36 <sup>a</sup>
AISLADO PROTEICO DE SOYA <sup>1/</sup>	88.40 <sup>b</sup>
CONCENTRADO PROTEICO DE LUPINUS <sup>2/</sup>	75.05 <sup>b</sup>
CONCENTRADO PROTEICO DE FRIJOLES ALADOS <sup>2/</sup>	73.52 <sup>b</sup>
HABAS CRUDAS <sup>3/</sup>	83.07 <sup>b</sup>
LENTEJAS CRUDAS <sup>3/</sup>	82.50 <sup>b</sup>
GARBANZOS CRUDOS <sup>3/</sup>	78.28 <sup>b</sup>
FRIJOLES SECOS CRUDOS <sup>3/</sup>	73.76 <sup>b</sup>
FRIJOLES PINTOS CRUDOS <sup>4/</sup>	72.70 <sup>b</sup>
FRIJOLES PINTOS EXTRUÍDOS <sup>4/</sup>	81.00 <sup>b</sup>

<sup>1/</sup> Swamylingappa y Srinivas (1994).

<sup>2/</sup> Sathe *et al.*, (1982).

<sup>3/</sup> Carbonaro *et al.*, (1997).

<sup>4/</sup> Balandrán-Quintana *et al.*, (1998).

<sup>a</sup> Digestibilidad verdadera (*in vivo*).

<sup>b</sup> Digestibilidad *in vitro*.

**Tabla 15.-** Aminoácidos esenciales en el aislado proteico y en los cotiledones de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -, y la razón entre cada uno de ellos y los del patrón de referencia de requerimientos de aminoácidos para niños de edad pre-escolar de la FAO/OMS/UNU de 1991<sup>1/</sup>.

AMINOÁCIDO ESENCIAL (mg/g proteína)	AISLADO PROTEICO	COTILEDONES <sup>2/</sup>	PATRÓN FAO/OMS/UNU	RAZÓN AISLADO/PATRÓN	RAZÓN COTILEDON/PATRÓN
ISOLEUCINA	25.6	34.3	28	0.91	1.22
LEUCINA	81.6	67.8	66	1.24	1.03
LISINA	75.2	62.2	58	1.30	1.07
METIONINA+ CISTINA	12.9	14.1	25	0.52	0.56
FENILALANINA+ TIROSINA	110.2	54.7	63	1.75	0.87
TREONINA	52.4	28.1	34	1.54	0.83
TRIPTOFANO	11.2	7.1	10	1.12	0.71
VALINA	35.2	51.5	35	1.01	1.47
HISTIDINA	28.1	16.7	19	1.48	0.88

<sup>1/</sup> Citado por Alanís-Guzmán (1995).

<sup>2/</sup> Fuente: González-Quijada (1996).



El aminoácido con la razón más baja es considerado el primer limitante y la razón del mismo representa el puntaje aminoacídico. Cuando este puntaje se corrige por la digestibilidad verdadera de la proteína su valor es indicativo de la calidad de la proteína evaluada. En la Tabla 16 se indican los valores de los puntajes aminoacídicos corregidos y sin corregir obtenidos para la proteína del aislado de la semilla de ébano.

Como se puede observar en la Tabla 15, el primer aminoácido limitante de la proteína del aislado obtenido son los azufrados (metionina+cistina). Esto concuerda con lo reportado en la literatura para aislados proteicos de otras especies de leguminosas (Henn y Netto, 1998; Okezie y Bello, 1988; Paredes-López *et al.*, 1991; Sosulski y McCurdy, 1987; Tjahjadi, 1988).

Con la excepción de los aminoácidos azufrados y de la isoleucina, los niveles del resto de los aminoácidos esenciales en el aislado proteico sobrepasan los del patrón de requerimientos de la FAO/OMS/UNU (ver Tabla 15).

El puntaje aminoacídico corregido por la digestibilidad en el aislado proteico es 0.44. Este valor es igual al encontrado por nosotros (González-Quijada, 1996) para la proteína en la semilla madura, completa, de ébano (mostrado también en la Tabla 16). De esto se infiere que el proceso de aislar a las proteínas de esta semilla no mejoró la calidad proteica de la misma, a pesar del incremento de la digestibilidad; debido a que el contenido total de los aminoácidos azufrados disminuyó con el proceso, como se puede apreciar en las Tablas 15 y 11. Sin embargo, al comparar los contenidos de

aminoácidos esenciales del aislado y de la semilla madura de ébano (cotiledones) con los del patrón de la FAO/OMS/UNU, puede notarse (Tabla 15) que el aislado satisface mejor los requerimientos señalados por el mencionado patrón, por lo cual es posible mejorar la calidad de su proteína en un grado mayor que en la semilla madura. Así, la suplementación con metionina podría incrementar el puntaje aminoacídico del aislado a un máximo de 0.91 (por la isoleucina, 2do. limitante); mientras que en la semilla madura solo sería posible aumentarlo hasta 0.71 (por la limitación del triptofano).

**Tabla 16.-** Puntaje aminoacídico, digestibilidad verdadera, y puntaje aminoacídico corregido por la digestibilidad de la proteína del aislado y de la semilla madura cruda de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

MATERIAL	PUNTAJE AMINOACÍDICO	DIGESTIBILIDAD <sup>IV</sup> VERDADERA (%)	PUNTAJE AMINOACÍDICO CORREGIDO
AISLADO PROTEICO	0.52	85.36	0.44
SEMILLA MADURA (CRUDA)	0.56	79.31	0.44

<sup>IV</sup> Determinada *in vivo* en ratas de la raza Sprague-Dawley.

En la Tabla 17 se han recopilado los puntajes aminoacídicos corregidos, la digestibilidad verdadera y el contenido proteico de algunos productos alimenticios procesados de leguminosas y cereales. Se puede apreciar que el puntaje aminoacídico corregido del aislado obtenido es más alto que el del aislado proteico de girasol y que el del trigo entero, pero más bajo que el de las leguminosas allí tabuladas, incluyendo al de las semillas de ébano cocidas. Con respecto a estas últimas, puede deducirse que el tratamiento térmico mejoró considerablemente la digestibilidad de su proteína y en consecuencia su puntaje aminoacídico. Por lo cual podría inferirse que sometiendo a calentamiento al aislado proteico estudiado se obtendrían resultados similares.

**Tabla 17.-** Puntaje aminoacídico corregido<sup>1/</sup>, contenido proteico y digestibilidad verdadera de la proteína del aislado de la semilla de ébano y de algunos productos alimenticios de leguminosas y cereales.

PRODUCTO	PROTEÍNA (N x 6.25) %	DIGESTIBILIDAD VERDADERA (%)	PUNTAJE AMINOACÍDICO CORREGIDO
<b>AISLADO PROTEICO DE SEMILLA DE ÉBANO</b>	<b>89.98</b>	<b>85.36</b>	<b>0.44</b>
AISLADO PROTEICO DE <sup>2/</sup> SEMILLA DE GIRASOL	92.7	94.0	0.37
SEMILLAS DE ÉBANO <sup>3/</sup> COCIDAS	37.4	94.0	0.56
HABAS COCIDAS <sup>2/</sup>	27.9	86.0	0.47
LENTEJAS COCIDAS <sup>2/</sup>	21.9	85.0	0.51
FRIJOLES PINTOS <sup>2/</sup> ENLATADOS	23.6	73.0	0.57
FRIJOLES NEGROS <sup>2/</sup> COCIDOS	21.7	72.0	0.53
CHÍCHAROS COCIDOS <sup>2/</sup>	15.7	84.0	0.61
GARBANZOS <sup>2/</sup> ENLATADOS	21.4	89.0	0.66
TRIGO ENTERO <sup>2/</sup>	16.2	91.0	0.40

<sup>1/</sup> Corregido por la digestibilidad verdadera de la proteína.

<sup>2/</sup> Fuente: Report of Joint FAO/WHO (1989).

<sup>3/</sup> Fuente: González-Quijada (1996).

<sup>3/</sup> Cocidas sin vaina y sin testa a ebullición a la presión atmosférica por 30 minutos.

## 5.- VALORACIÓN FUNCIONAL DEL AISLADO PROTEICO

Los resultados de la determinación de las propiedades funcionales del aislado proteico de la semilla de ébano se reportan en la Tabla 18.

Las propiedades funcionales de las proteínas dependen tanto de la naturaleza de éstas como de las condiciones de su procesamiento. En la Tabla 19 se han recopilado, como referencia comparativa, los valores de las propiedades funcionales de aislados proteicos de varias leguminosas de uso común en la alimentación humana.

### 5.1.- CAPACIDADES DE ABSORCIÓN DE AGUA Y GRASA

Como se puede observar en la Tabla 19, el aislado proteico obtenido en nuestro estudio mostró una capacidad de absorción de agua concordante con la de los aislados de las otras leguminosas allí tabuladas. Su valor es aproximadamente igual al del aislado de habas (Sosulski y McCurdy, 1987) pero ligeramente inferior al de los otros aislados referidos (Sosulski y McCurdy, 1987; Sathe y Salunkhe, 1981). El valor encontrado por nosotros para esta propiedad funcional es más alto que el reportado por Tjahjadi *et al.* (1988) en aislado proteico de frijoles adzuki (1.58 g H<sub>2</sub>O/g aislado) y comparable al determinado por Paredes-López *et al.*, (1991) en aislados de garbanzos (2.4 ml H<sub>2</sub>O/g proteína).

**Tabla 18.-** Propiedades funcionales del aislado proteico obtenido de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

PROPIEDAD FUNCIONAL	VALOR <sup>U</sup>
CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA (g H <sub>2</sub> O/g aislado)	2.14 ± 0.02
CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE GRASA (g grasa/g aislado)	1.10 ± 0.01
CONCENTRACIÓN MÍNIMA DE GELIFICACIÓN (% w/v)	8.00 ± 0.00
CAPACIDAD EMULSIFICANTE (ml aceite/g aislado)	463 ± 1.00
CAPACIDAD ESPUMANTE (% incremento de volumen)	83 ± 2.00
SOLUBILIDAD A 25°C y pH 7.0 (%)	36.35 ± 0.46

<sup>U</sup> Valores promedios de tres determinaciones ± desviación estándar.

**Tabla 19.-** Propiedades funcionales del aislado proteico de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – y las de aislados de otras leguminosas.

PROPIEDAD FUNCIONAL	AISLADOS PROTEICOS				
	ÉBANO	SOYA <sup>1/</sup>	GUISANTES <sup>1/</sup>	HABAS <sup>1/</sup>	FRIJOL GRAN NORTEÑO <sup>2/</sup>
CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA (g H <sub>2</sub> O/g aislado)	2.14	2.65	2.52	2.16	2.73
CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE GRASA (g grasa/g aislado)	1.10	1.03	0.98	1.78	1.57
CONCENTRACIÓN MÍNIMA DE GELIFICACIÓN (% w/v)	8.0	---	---	---	12.0
CAPACIDAD EMULSIFICANTE (ml aceite/g aislado)	463	451	366	386	72.5
CAPACIDAD ESPUMANTE (% incremento de volumen)	83	185	157	100	6.00
SOLUBILIDAD A 25°C, pH 7.0 (%)	36.35	30.60	38.10	40.00	---

<sup>1/</sup> Sosulski y McCurdy (1987).

<sup>2/</sup> Sathe y Salunkhe (1981).

Como se mencionó anteriormente, las condiciones experimentales operadas en el proceso de obtención de los aislados juegan un papel importante en los valores determinados para esta y las otras propiedades funcionales. Por eso, para aislados de la misma especie de leguminosa se encuentran en la literatura valores diferentes de una misma propiedad funcional. Elizalde *et al.*, (1991) al estudiar la estabilidad de las emulsiones de varios materiales proteicos, determinaron la capacidad de absorción de agua de 7 aislados de soya comerciales y de uno obtenido en el laboratorio; reportando para esta propiedad valores que oscilan desde 2.48 hasta 19.9 ml H<sub>2</sub>O/ g proteína. Sathe y Salunkhe (1981) refieren que el agua absorbida por las proteínas es función de varios parámetros, entre los cuales mencionan: características conformacionales de la molécula de proteína, factores estéricos, balance de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, presencia de lípidos y carbohidratos asociados con las proteínas, medio ambiente fisicoquímico (pH, fuerza iónica, temperatura, etc.) y propiedades termodinámicas del sistema.

El aislado proteico de la semilla de ébano fue evaluado para su capacidad de absorción de agua (al igual que para las otras propiedades funcionales) en su forma isoelectrónica, donde su solubilidad es mínima y las interacciones proteína-proteína son máximas. De acuerdo con lo antes señalado, los cambios conformacionales en las moléculas de proteínas generadas por estas interacciones, bajo la influencia del pH del medio, pueden haber expuesto o encubierto a sitios hidrofílicos de las proteínas, afectando de una u otra forma su capacidad de absorber agua.

Respecto a la capacidad de absorción de grasa, esta propiedad funcional del aislado proteico investigado resultó ligeramente más alta que la de los



aislados de soya y guisantes reseñados en la Tabla 19, aunque un poco más baja que la de los aislados de haba y frijoles Gran Norteño. También es más alta que la del aislado proteico de soya (0.83 ml/g) utilizado por Idouraine *et al.*, (1991) como control en sus investigaciones con frijol Tepary y comparable a la del aislado proteico de garbanzos (1.7 ml/g proteína) determinada por Paredes-López *et al.*, (1991).

La capacidad de absorción de grasa también es función de los parámetros señalados por Sathe y Salunkhe (1981), antes mencionados, y al igual que la absorción de agua es afectada por los cambios conformacionales que pueden haber sufrido las moléculas de proteínas durante el procesamiento del aislado; aunque en este caso está en relación directa con el número de sitios hidrofóbicos (no polares) de las cadenas de proteínas que esten disponibles para enlazarse con las moléculas de lípidos.

Circle *et al.*, citados por Okezie y Bello (1988) refieren que la capacidad de absorber grasa puede determinar si un material proteico tendría un buen desempeño como extensor de carne en una preparación alimenticia. Como hemos podido apreciar, la capacidad de absorción de grasa del aislado proteico de la semilla de ébano es comparable al de aislados de soya, y en algunos casos superior. Puesto que la soya es la leguminosa más utilizada como extensor en productos cárnicos; se puede inferir que el aislado de la semilla de ébano podría también ser usado con este fin.

## 5.2.- SOLUBILIDAD DEL AISLADO

El perfil de solubilidad del aislado proteico de la semilla de ébano fue determinado en el rango de pH de 1 a 11. Los resultados se muestran en la Tabla 20 y se representan en la Figura 11. Puede notarse en ellos que la solubilidad del aislado es baja a valores de pH ácidos y alta a pH alcalinos. Siendo mínima entre pH 2 y 3, donde se ubican los puntos isoeléctricos de las fracciones proteicas principales de la semilla (ver Tabla 4 y Figuras 6, 7 y 8), y máxima a pH 11 donde la extracción de proteínas fue también máxima (ver Tabla 6 y Figura 10). En el intervalo de pH entre 4 y 7 la solubilidad del aislado osciló entre el 32 y 37% para luego aumentar progresivamente con el pH, alcanzando el 99% a pH 11.

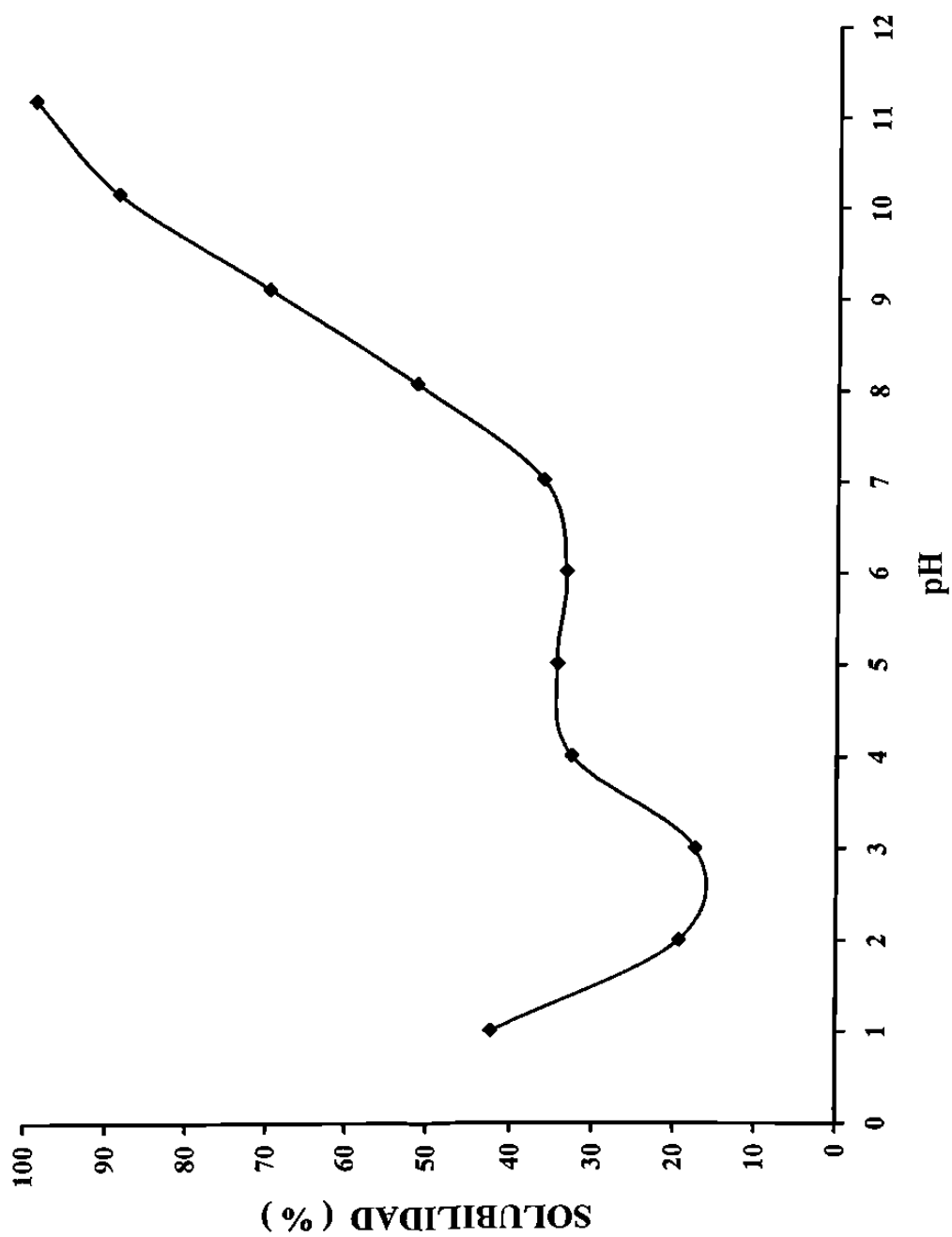
Tendencias análogas a la descrita han sido reportadas por varios investigadores para la solubilidad de aislados proteicos de diferentes leguminosas. Sosulski y McCurdy (1987) en aislados de soya, habas y guisantes; Okezie y Bello (1988) en el de frijoles alados; King *et al.*, (1985) en el de lupinus; Tjahjadi *et al.*, (1988) en el de frijoles adzuki; Idouraine *et al.*, (1991) y Qi *et al.*, (1997) en aislados de soya. A pH 7.0 la solubilidad del aislado proteico de la semilla de ébano (36.35%) es más alta que la del aislado de soya referido en la Tabla 9 (30.60%) y que la de los aislados de soya reportados por Paredes-López *et al.*, (1991) e Idouraine *et al.*, (1991) (21.2 y 28.0% respectivamente).

**Tabla 20.- Solubilidad del aislado<sup>1/</sup> proteico de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – a diferentes valores de pH.**

PH	SOLUBILIDAD <sup>2/</sup> (%)
1	42.42 ± 0.76
2	19.39 ± 0.25
3	17.42 ± 0.62
4	32.74 ± 0.64
5	34.54 ± 0.44
6	33.45 ± 1.06
7	36.35 ± 0.46
8	51.55 ± 0.63
9	70.05 ± 0.79
10	88.87 ± 0.77
11	99.17 ± 0.23

<sup>1/</sup> Valores promedios de tres repeticiones ± desviación estándar.

<sup>2/</sup> Determinaciones realizadas a 25°C.



**Figura 11.-** Solubilidad del aislado proteico de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – a diferentes valores de pH.

Como era de esperarse, el aislado proteico obtenido exhibió su solubilidad más baja en los alrededores del punto isoeléctrico de precipitación (pH 2.6) debido, probablemente, a que la ausencia de una carga eléctrica neta en los polímeros favoreció su agregación, minimizando la interacción proteína-solvente. Al alejarse de dicho punto se van desplegando las proteínas por efectos del pH y aumentando las interacciones con el solvente con el consiguiente incremento de la solubilidad.

La solubilidad mostrada por el aislado en el rango de pH 4-7 (Figura 11) favorecería su uso en una amplia gama de productos alimenticios, desde yogurth hasta cárnicos.

En la Figura 10A del apéndice A se representa la curva de mejor ajuste para la regresión no lineal entre la solubilidad del aislado y el pH, y en la Tabla 8A la ecuación correspondiente y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). En razón del alto valor de este coeficiente se puede utilizar la ecuación cuadrática obtenida en la regresión para predecir la solubilidad del aislado en función del pH.

### **5.3.- CAPACIDAD EMULSIFICANTE**

El aislado proteico de la semilla de ébano mostró una alta capacidad emulsificante (463 ml aceite/g aislado). Este valor es más alto que la de los aislados de soya, habas y guisantes (Sosulski y McCurdy, 1987) y frijoles Gran Norteño (Sathe y Salunkhe, 1981) referidos en la Tabla 19; así como también mayor que la de los aislados de soya (371 ml aceite/g aislado) y frijoles adzuki (402 ml aceite/g

aislado) obtenidos por Tjahjadi *et al.*, (1988) y que la determinada por Idouraine *et al.*, (1991) en el aislado de soya (312 ml aceite/ g proteína).

La alta capacidad emulsificante observada en el aislado investigado podría estar relacionado con la naturaleza de sus proteínas y con la relación de grupos o sitios hidrófobos e hidrófilos en ellas. Investigaciones realizadas por Sathe y Salunkhe (1981) en frijoles Gran Norteño , por Idouraine *et al.*, (1991) en frijol Tepary y por Tjahjadi *et al.*, (1988) en frijoles adzuki, en las cuales se evaluaron las capacidades emulsificantes de las albúminas y globulinas de esas semillas, revelaron que las albúminas tienen la capacidad emulsificante más alta, en las tres leguminosas estudiadas. Considerando esos resultados y relacionándolos con nuestro estudio, donde se encontró que las albúminas son las proteínas más abundantes en la semilla de ébano (ver Tabla 2), podríamos atribuir, en gran medida, la elevada capacidad emulsificante a la preponderancia de esa fracción proteica en el aislado. Por otra parte, la acción emulsificadora de las proteínas depende de la rapidez con la cual puedan migrar estos polímeros hacia la interfase aceite-agua y desdoblarse y reorientarse, de tal manera que sus sitios hidrófobos (apolares) estén dirigidos hacia la fase lipídica y los hidrofílicos (polares) hacia la acuosa; para ello es necesario que la molécula proteica tenga el balance adecuado de grupos hidrófobos e hidrofílicos. Por las capacidades de absorción de grasa y de agua, relativamente altas del aislado proteico de la semilla de ébano, podríamos inferir que en sus proteínas debe haber un buen balance de ambos grupos, lo cual facilita su capacidad emulsificadora.

En la Tabla 21 y la Figura 12 se muestran los valores de la capacidad emulsificante del aislado proteico estudiado, a diferentes concentraciones de NaCl. Puede notarse que dicha capacidad se incrementó a bajas concentraciones salinas, (0.25 y 0.50 M) pero decreció gradualmente al aumentar la concentración de sal

sobre 0.5 M. Tendencias similares a estas fueron observadas por King *et al.*, (1985) en aislados proteicos de lupinus y por Abbey e Ibeh (1987, 1988) y Liu y Hung (1998) en harina de frijoles marrones y de chícharos y en concentrados proteicos de garbanzos, respectivamente. Dench (1982) atribuye este comportamiento a los cambios de solubilidad de las proteínas por el efecto de las sales. A una fuerza iónica baja, los iones de la sal tienden a unirse a los grupos cargados opuestamente en las proteínas, contribuyendo al decrecimiento de las interacciones electrostáticas intermoleculares lo cual conduce a un incremento de la solubilidad proteica y de la capacidad emulsificante. Sin embargo, a una fuerza iónica alta ocurre el efecto de “insolubilización por salado” mediante el cual los iones se hidratan fuertemente, permitiendo una mayor interacción entre los polímeros con el consiguiente decrecimiento de la solubilidad y de la capacidad emulsificante.

Mittal y Osborne, citados por Sosulski y McCurdy (1987) refieren que las harinas y aislados proteicos de soya son excelentes emulsificadores y extensores en alimentos altos en grasa, y esta característica la asocian con sus capacidades emulsificantes y de absorción de agua y grasa. En este estudio determinamos que el aislado proteico de la semilla de ébano tiene capacidades de absorción de agua y grasa equiparables a los del aislado de soya, siendo su capacidad emulsificante mayor que la de él; en base a ello se infiere que el aislado de la semilla de ébano podría servir también como agente emulsificante y extensor en muchas preparaciones alimenticias como los cárnicos, aderezos, etc.

En la Figura 11A del apéndice A se puede apreciar la curva de mejor ajuste para la regresión no lineal realizada entre la capacidad emulsificante del aislado proteico obtenido y la concentración molar de NaCl, y en la Tabla 9A se presenta la ecuación ajustada de regresión y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). El valor de

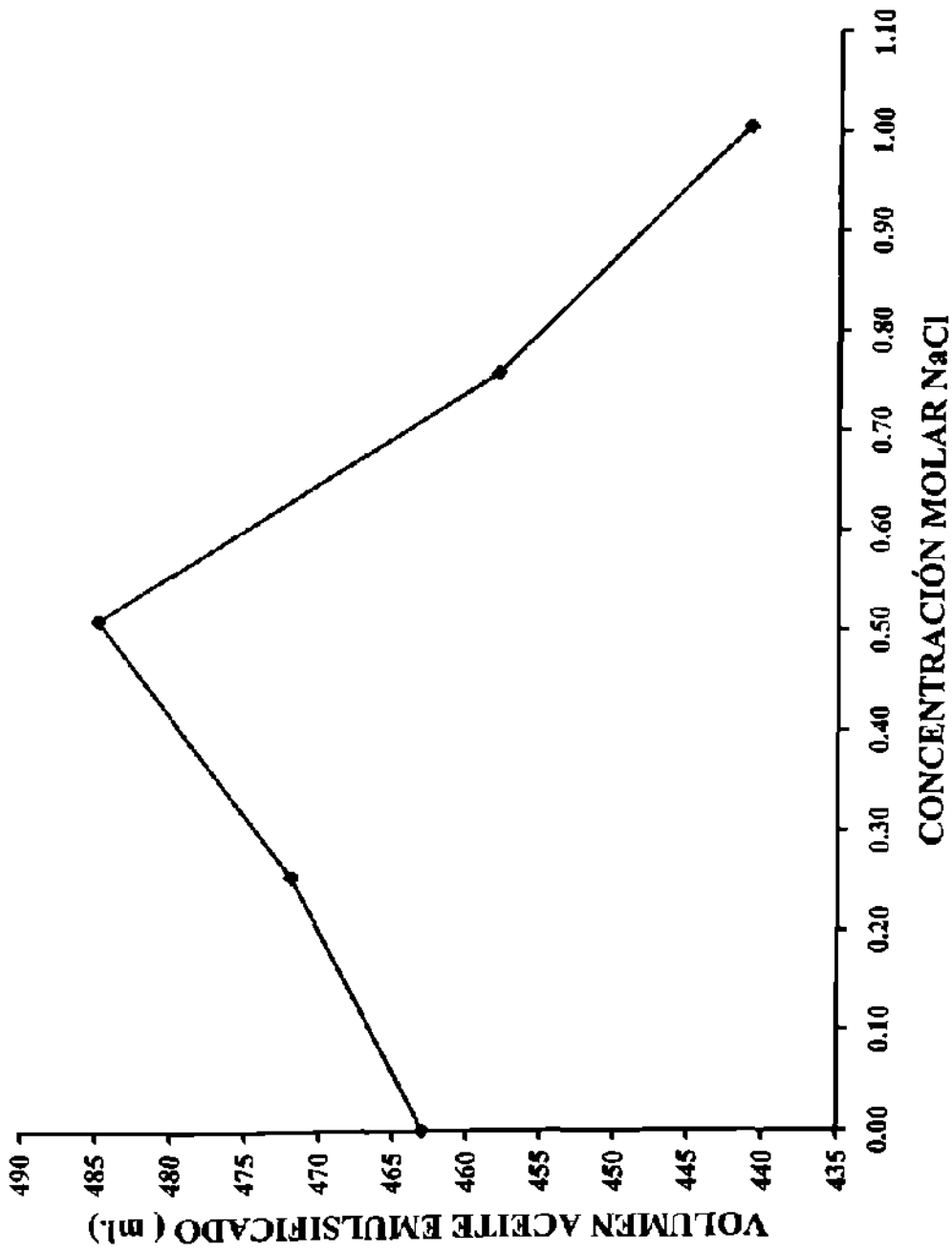
este coeficiente ( $R^2 = 1$ ) evidencia el ajuste perfecto del plano de regresión con los puntos experimentales, por lo cual se puede utilizar esa ecuación para predecir la capacidad emulsificante del aislado proteico en función de la concentración molar de NaCl.

**Tabla 21.-** Efecto de la concentración de sal (NaCl) sobre la capacidad emulsificante del aislado proteico de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

CONCENTRACIÓN MOLAR DE NaCl	CAPACIDAD EMULSIFICANTE <sup>V</sup> (ml aceite/g aislado)
0.00	463 ± 1.00
0.25	472 ± 0.81
0.50	485 ± 1.24
0.75	458 ± 1.63
1.00	441 ± 1.61

<sup>V</sup> Los valores son promedios de tres repeticiones ± desviación estándar.





**Figura 12.-** Efecto de la concentración de NaCl sobre la capacidad emulsificante del aislado proteico de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

#### **5.4.- CAPACIDAD ESPUMANTE**

La capacidad espumante determinada en el aislado proteico de la semilla de ébano resultó ser de un valor relativamente bajo (83%), al compararla con la de varios aislados proteicos de leguminosas referidos en la literatura. Si se observa la Tabla 19 puede notarse que, con la excepción del aislado de frijoles Gran Norteño, su capacidad espumante es considerablemente más baja que la de los aislados de soya, guisantes y habas allí tabulados; también es mucho menor que la del aislado de soya utilizado como control por Swamylingappa y Srinivas (1994) cuyo valor es del 160%, aunque es comparable a la del aislado de frijoles alados (82%) determinada por Okezie y Bello (1988).

En términos aclaratorios, consideramos necesario mencionar que para la determinación analítica de una misma propiedad funcional se encuentran en la literatura metodologías diferentes. Por esta razón, tanto para la capacidad espumante como para las demás propiedades funcionales consideradas, solamente hemos tomado como referencias comparativas los resultados de investigaciones realizadas con la misma técnica metodológica utilizada en nuestro trabajo.

En relación con la estabilidad de la espuma del aislado investigado, mediciones del volumen de ésta tomadas a los 20, 40, 60 y 120 minutos revelaron un decrecimiento del volumen inicial de la misma del orden del 38, 75 y 92% para los tres primeros lapsos de tiempo mencionados, en el mismo orden respectivo y un colapso total a los 120 minutos. Estos

resultados evidencian una gran inestabilidad si se comparan con la estabilidad de la espuma de los aislados proteicos de soya, guisantes y habas estudiados por Solsulsky y McCurdy (1987) para los cuales a los 120 minutos se habían colapsado el 33, 44 y 70% del volumen inicial de sus espumas, respectivamente.

Como se puede apreciar en los resultados obtenidos, el aislado proteico de la semilla de ébano exhibió una buena capacidad emulsificante, sin embargo su capacidad para formar espumas es baja. Petrucelli y Añón (1994) señalan que en ambos procesos las proteínas deben migrar hacia una interfase y formar películas estables, pero por la naturaleza diferente de éstas son requeridas características estructurales diferentes de las proteínas. El proceso de formación de espuma es más lento que el de la emulsificación, puesto que el aire es incorporado a medida que ocurre la migración de las moléculas proteicas hacia la interfase, seguido por la desnaturalización de las proteínas en ella. Yildirim (1996) refiere que para la eficiente formación de espuma es importante la existencia de moléculas flexibles, mientras que en la estabilidad de la espuma desempeña un papel primordial la elasticidad y cohesión molecular. La conformación de las moléculas proteicas también influye; Graham y Phillips, citados por Sathe *et al.* (1982) observaron que moléculas de proteínas globulares altamente ordenadas son difíciles de desnaturalizarse en la superficie, dando una baja espumabilidad.

En concordancia con lo anterior, la baja capacidad espumante del aislado proteico de la semilla de ébano puede estar relacionada con factores inherentes a la estructura y conformación de sus moléculas proteicas, entre los cuales podrían mencionarse la poca flexibilidad de ellas y su grado de

ordenamiento; aunado todo esto a la influencia de factores medio ambientales como el pH del entorno y la tensión en la interfase. Por otra parte, la inestabilidad de la espuma formada podría asociarse con un grado bajo de elasticidad y cohesión molecular y probablemente a las repulsiones electrostáticas en la película formada alrededor de las burbujas de aire. Sin embargo la baja capacidad espumante aunque limita su uso en algunos productos, es deseable para lograr una mejor recuperación de las proteínas en el proceso de obtención del aislado.

## **5.5.- CAPACIDAD DE GELIFICACIÓN**

La concentración mínima de gelificación determinada en el aislado proteico de la semilla de ébano fue de 8% (w/v). Esta es más baja que la de los aislados proteicos de frijoles Gran Norteño (12%), lupinus (14%), frijoles adzuki (20%), frijoles alados (18%), reportados por Sathe y Salunkhe (1981), King *et al.* (1985), Tjahjadi *et al.* (1988) y Okezie y Bello (1988) respectivamente; y también es menor que la de los aislados de soya (13, 16 y 14%) usados como control en sus investigaciones por los tres últimos autores nombrados.

Mientras menor sea la concentración a la cual un material proteico pueda formar geles firmes, mayor será su capacidad gelificante. En base a esto, se infiere que el aislado proteico estudiado tiene capacidad de gelificación alta si se compara con la de los aislados antes referidos.

La gelificación es, por lo general, una agregación de moléculas desnaturalizadas y, contraria a la coagulación donde la agregación es fortuita sin ordenamiento definido, en ella se forma una estructura de red continua la cual exhibe un cierto ordenamiento (Hermansson, citado por Okezie y Bello, 1988). Sathe y Salunkhe (1981) mencionan que la gelificación no solamente es función de la cantidad de proteína, sino también del tipo de proteína y de los componentes no proteicos; estos autores determinaron que las globulinas de frijoles Gran Norteño no formaron geles firmes en el rango de concentración de 2-20% (w/v), al contrario de las albúminas para las cuales la concentración mínima de gelificación fue del 18% (w/v).

En concordancia con lo anterior, podríamos atribuir la alta capacidad gelificante mostrada por el aislado proteico de la semilla de ébano a la abundancia de las albúminas en la semilla y al grado de desnaturalización que puedan haber sufrido sus proteínas durante el calentamiento efectuado en el proceso de gelificación.

Por su alta capacidad de gelificación el aislado proteico de la semilla de ébano podría ser usado como ingrediente funcional en aplicaciones alimenticias donde se requiera esta propiedad.

## CONCLUSIONES

- 1.- En la semilla madura de ébano las fracciones proteicas principales son las albúminas y globulinas, siendo las primeras las más abundantes. Las glutelinas se encontraron en bajos contenidos y las prolaminas en cantidades inferiores al 2%.
- 2.- Las albúminas y globulinas de la semilla de ébano están compuestas por proteínas que tienen puntos isoeléctricos diferentes. Unas precipitan a pH ácidos y otra a pH básicos, siendo más abundantes, en ambas fracciones, las que tienen puntos isoeléctricos a valores de pH ácidos.
- 3.- El punto isoeléctrico de las albúminas, globulinas y glutelinas osciló dentro del rango de pH 2.3 a 2.7, debido a la abundancia de aminoácidos de carácter ácido en sus proteínas.
- 4.- El perfil electroforético de las albúminas, globulinas y glutelinas de la semilla de ébano muestra que estas se componen de proteínas con pesos moleculares diferentes que van desde 21.6 hasta 100 kDa. En las albúminas se encuentran las subunidades proteicas de mayor peso molecular en la semilla (92 y 100 kDa).

- 5.- Las condiciones óptimas de pH y temperatura para la extracción de proteínas de la harina desgrasada de la semilla madura de ébano son 11.0 y 25°C, respectivamente. En esas condiciones, con la combinación de extractantes utilizada, se extrajo alrededor del 92% de las proteínas de la semilla.
- 6.- Por precipitación isoelectrica de la proteína a pH 2.6 se obtuvo el aislado proteico de la semilla de ébano con un rendimiento del 45.6%, en base al contenido total de proteínas de la semilla. La variabilidad de puntos isoelectricos encontrados en las diferentes fracciones proteicas de la semilla y la combinación de extractantes utilizada influyeron en el rendimiento alcanzado.
- 7.- El aislado proteico de la semilla de ébano es alto en contenidos de lisina, leucina, treonina, fenilalanina y tirosina pero bajo en los de isoleucina y aminoácidos azufrados (metionina+cistina), siendo estos azufrados el primer limitante.
- 8.- Con la excepción de la isoleucina y de los aminoácidos azufrados, los niveles de los demás aminoácidos esenciales del aislado proteico obtenido sobrepasan los requerimientos del patrón de referencia de la FAO/OMS/UNU de 1991 para niños de edad preescolar.

- 9.- El contenido de compuestos antinutricionales (taninos, fitatos e inhibidores de tripsina) encontrados en el aislado proteico de la semilla de ébano es más bajo que el de la harina cruda de dicha semilla, lo cual evidencia que estos compuestos disminuyeron por efectos del procesamiento realizado para aislar a las proteínas.
- 10.- La reducción de compuestos antinutricionales observada en el aislado determinó un ligero incremento en la digestibilidad verdadera de la proteína de la semilla.
- 11.- A pesar del aumento de la digestibilidad verdadera de la proteína en el aislado, su puntaje químico aminoacídico es igual al de la semilla madura de la cual se obtuvo. Lo cual indica que la calidad de la proteína no cambió con el procesado, debido al descenso de los niveles de aminoácidos azufrados ocurridos durante el mismo.
- 12.- Con la excepción de la formación de espumas, el aislado proteico de la semilla de ébano mostró buenas propiedades funcionales. Sus capacidades de absorción de agua y grasa son equiparables a las de la soya y a las de otras leguminosas tradicionalmente comestibles, siendo sus capacidades emulsificantes y de gelificación mayores que las de ellas.



## RECOMENDACIONES

- 1.- Por su alto contenido proteico y el nivel de aminoácidos esenciales de sus proteínas, se recomienda utilizar el aislado proteico de la semilla de ébano en la alimentación humana.
- 2.- Debido a sus niveles altos de lisina y treonina puede usarse el aislado proteico obtenido para suplementar alimentos con bajos contenidos de estos aminoácidos, como por ejemplo, los cereales.
- 3.- En razón de que el cocimiento reduce compuestos antinutricionales e incrementa la digestibilidad de las proteínas, se sugiere investigar si el tratamiento térmico puede mejorar la calidad de la proteína del aislado de la semilla de ébano.
- 4.- Por las promisorias propiedades funcionales exhibidas por el aislado proteico investigado, se recomienda evaluarlo como ingrediente funcional en preparaciones alimenticias, en especial en aquellas donde actúe como emulsificador y gelificador.

## LITERATURA CITADA

- Abbey, B.W. and Ibeh, G.O. 1987. **Functional-properties of raw and heat processed Brown Bean (*Canavalia rosea* DC) flour.** J. Food Sci. 52(2):406-408.
- Abbey, B.W. and Ibeh, G.O. 1988. **Functional properties of raw an heat processed cowpea (*Vigna unguiculata*, Walp) flour.** J. Food Sci. 53(6):1775-1791.
- Alanís-Guzmán, M.G. 1995. **Chemical, nutritional and functional characterization of proteins extracted from wild mustard.** Economic Botany. 49(3):260-268.
- AOAC. 1990. **Official Methods of Analysis**, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. USA. p. 879.
- Aw, T.L. and Swanson, B.G. 1985. **Influence of tannin on *Phaseolus vulgaris* protein digestibility and quality.** J. Food Sci. 50:67-71.
- Badui, S. 1993. **Química de los Alimentos**. 3a. ed. Edit. Alhambra Mexicana, México, D.F. pp. 133, 137, 138, 181-184,626.
- Balandrán-Quintana, R.R.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Zazueta-Morales, J.J.; Anzaldúa-Morales, A. And Quintero-Ramos, A. 1998. **Functional and nutritional properties of extruded whole pinto bean meal (*Phaseolus vulgaris* L.).** J. Food Sci. 63(1):113-116.
- Barampama, Z. and Simard, R.E. 1994. **Oligosaccharides antinutritional factors, and protein digestibility of dry beans as affected by processing.** J. Food Sci. 59(4):833-838.

- Bello, A.B. and Okezie, B.O. 1989. **Effect of extraction conditions on the extractability of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC) proteins.** J. Food Sci. 54(6):1989-1990.
- Bera, M.B. and Mukherjee, R.K. 1989. **Solubility, emulsifying and foaming properties of rice bran protein concentrates.** J. Food Sci. 54:142.
- Bhatty, R.S. 1982. **Albumin proteins of eight edible grain legume species: Electrophoretic patterns and amino acids composition.** J. Agric. Food Chem. 30:620.
- Boatright, W.L. and Hettiarachchy, N.S. 1995. **Spray-dried soy protein isolate solubility, gelling characteristics, and extractable protein as affected by antioxidants.** J. Food Sci. 60(4):806-809.
- Boulter, D. 1977. **Protein quality from leguminous crops.** Commission of the European Communities, Coordination of Agricultural Research; Luxembourg; EUR 5686 EN. pp. 11-47.
- Britten, M. and Lavoie, L. 1992. **Foaming properties of proteins as affected by concentration.** J. Food Sci. 57(5):1219.
- Carbonaro, M.; Cappelloni, M.; Nicoli, S.; Lucarini, M. and Carnovale, E. 1997. **Solubility-Digestibility Relationship of Legume Proteins.** J. Agric. Food Chem. 45(9):3387-3394.
- Chan, L.E. 1983. **Heat-induced changes in the proteins of whey protein concentrate.** J. Food Sci. 48:47.
- Chan, Ch. and Phillips, D. 1994. **Amino acid composition and subunit constitution of protein fractions from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) seeds.** J. Agric. Food Chem. 42:1857-1860.
- Chen, T.H.H.; Gusta, L.V.; Tjahjadi, C. and Breene, W.M. 1984. **Electrophoretic characterization of adzuki bean (*Vigna angularis*) seed proteins.** J. Agric. Food Chem. 32:396-399.

- Chen, B.H.Y. and Morr, C.V. 1985. **Solubility and foaming properties of phytate-reduced soy protein isolate.** *J. Food Sci.* 50:1139-1142.
- Cherry, J.P. 1981. **Functionality in Foods.** ACS Symposium Series 147, American Chemical Society. Washington, D.C. p. 92.
- Coffmann, C.W. and García, V.V. 1977. **Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour.** *J. Food Technol.* 12:473.
- Correl, D.S. and Johnston, M.C. 1970. **Manual of vascular plants of Texas.** Texas Research Foundation. Renner, Texas, USA. p. 769.
- Davis, K.R. 1981. **Proximate composition, phytic acid, and total phosphorus of selected breakfast cereals.** *Cereal Chem.* 58(4):347-350.
- Dench, J.E. 1982. **Extraction of nitrogeous material from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC) flours and the preparation and properties of protein isolates.** *J. Sci. Food Agric.* 33:173-184.
- Desphande, S.S. and Cheryan, M. 1985. **Evaluation of vainillin assay for tannin analysis of dry beans.** *J. Food Sci.* 50:905-910.
- Desphande, S.S. and Cheryan, M. 1987. **Determination of phenolic compounds of dry beans using vainillin, redox and precipitation assay.** *J. Food Sci.* 52(2):332-334.
- Durandhar, N.V. and Chang, K.C. 1990. **Effect of cooking on firmness, trypsin inhibitors, lectins and cystine/cysteine content of navy and red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*).** *J. Food Sci.* 55(2):470-474.
- Elizalde, B.E.; Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B. 1991. **Prediction of emulsion instability from emulsion composition and physicochemical properties of proteins.** *J. Food Sci.* 56(1):116-120.

- Freifelder, D. 1982. **Physical Biochemistry**. 2a. ed. San Francisco. USA. p. 62.
- Giral, F.; Sotelo, A.; Lucas, B. and De la Vega, A. 1978. **Chemical composition and toxic factors content in fifteen leguminous seeds**. Quart. J. Crude Drug Res. 16(3):143-149.
- González-Quijada, M.R. 1996. **Evaluación de algunos parámetros nutricionales de la semilla de ébano (*Pithecellobium flexicaule* Benth.) relacionados con potenciales usos en la alimentación humana**. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.San Nicolás de los Garza, N.L., México. pp. 44-93.
- Gossett, P.W., Rizvi, S.S.H. and Baker, R.C. 1984. **Quantitative analysis of gelation in egg protein systems**. Food Technol., 38(5):67.
- Gustafsson, E.L. and Sandberg, A.S. 1995. **Phytate reduction in brown beans (*Phaseolus vulgaris* L.)**. J. Food Sci. 60(1):149-152.
- Handa, A.; Takahashi, K.; Kuroda, N. and Froning, G.W. 1998. **Heat-induced egg white gels as affected by pH**. J. Food Sci. 63(3):403-407.
- Henn, R.L. and Netto, F.M. 1998. **Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates**. J. Agric. Food Chem. 46(8):3009-3015.
- Heredia, N.L.; Labbé, R.G. and García-Alvarado, J.S. 1998. **Alteration in sporulation, enterotoxin production, and protein synthesis by *Clostridium perfringens* type A following heat shock**. J. Food Prot. 61(9):1143-1147.
- Hermansson, A.M. 1979. **Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins**. J. Am. Oil Chemist's Soc., 56:272-278.

- Hillier, R.M.; Lyster, R.L.J. and Cheeseman, G.C. 1980. **Gelation of reconstituted whey powders.** *J. Sci. Food Agric.* 31:1152.
- Huesa, A. 1983. **Concentrados y aislados proteínicos a partir de harina de oleaginosas.** Alimentación: Equipos y Tecnología. España. p. 97.
- Idouraine, A.; Yensen, S.B. and Weber, C.W. 1991. **Tepary bean flour, albumin and globulin fractions functional properties compared with soy protein isolate.** *J. Food Sci.* 56(5):1316-1318.
- Joint FAO/WHO Expert Consultation. 1989. **Protein quality evaluation.** Bethesda, Mo. USA. pp. 4-8, 27, 32-39.
- Kakade, M.L.; Rackis, J.J.; McGhee, J.E., and Puski, G. 1974. **Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure.** *Cereal Chem.* 51:376-382.
- Kanterewicz, R.J.; Elizalde, B.E.; Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B. 1987. **Water-oil absorption index (WOAI): A simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins.** *J. Food Sci.* 52(5):1381-1383.
- Ker, Y.C. and Toledo, R.T. 1992. **Influence of shear treatments on consistency and gelling properties of whey protein isolate suspensions.** *J. Food Sci.* 57(1):82-85.
- King, J.; Aguirre, C. and de Pablo, S. 1985. **Functional properties of lupin protein isolates (*Lupinus albus* cv Multolupa).** *J. Food Sci.* 50:82-87.
- Kinsella, J.E. 1976. **Functional properties of proteins in food: A survey.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7:219.

- Liadakis, G.N.; Tzia, C.; Oreopoulou, V. and Thomopoulos, C.D. 1998. **Isolation of tomato seed meal proteins with salt solutions.** J. Food Sci. 63(3):450-453.
- Liu, L.H. and Hung, T.V. 1998. **Functional properties of acetylated chickpea proteins.** J. Food Sci. 63(2):331-337.
- Moore, S. and Stein, W.H. 1963. **Chromatographic determination of amino acids by use of automatic recording equipment.** Meth. Enzymol. 6:819.
- Naczk, M.; Rubin, L.J., and Shahidi, F. 1986. **Functional properties and phytate content of pea protein preparations.** J. Food Sci. 51(5):1245-1247.
- Okezie, B.O. and Bello, A.B. 1988. **Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate.** J. Food Sci. 53(2):450-454.
- Paredes-López, O.; Ordorica, C. and Olivares, M.R. 1991. **Chickpea protein isolates: Physicochemical, functional and nutritional characterization.** J. Food Sci. 56(3):726-729.
- Pellet, P.L. y Young, V.R. Editores. 1980. **Evaluación nutricional de alimentos proteínicos.** Publicación Técnica. UNU. pp. 3-145.
- Petrucelli, S. and Añón, M.C. 1994. **Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 2. Surface properties.** J. Agric. Food Chem. 42(10):2170-2176.
- Petrucelli, S. and Añón, M.C. 1995. **Soy protein isolate components and their interactions.** J. Agric. Food Chem. 43:1762-1767.

- Phillips, L.G.; German, J.B.; O'Neill, T.E.; Foeceding, E.A.; Harwalkar, V.R.; Kilara, A.; Lewis, B.A.; Mangino, M.E.; Morr, C.V.; Regenstein, J.M.; Smith, D.M. and Kinsella, J.E. 1990. **Standardized procedure for measuring foaming properties of three proteins, A Collaborative Study.** J. Food Sci. 55(5):1441-1453.
- Preece, M.L.; Van Scoyoc, S., and Butler, L.G. 1978. **A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in Sorghum grain.** J. Agric. Food Chem. 26(5):1214-1218.
- Proulx, W.R.; Weaver, C.M., and Bock, M.A. 1993. **Trypsin inhibitor activity and tannin content do not affect calcium bioavailability of three commonly consumed legumes.** J. Food Sci. 58(2):382-384.
- Puppo, M.C. and Añón, M.S. 1998. **Effect of pH and protein concentration on rheological behavior of acidic soybean protein gels.** J. Agric. Food Chem. 46(8):3039-3046.
- Puppo, M.C.; Lupano, C.E., and Añón, M.C. 1995. **Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration.** J. Agric. Food Chem. 43(9):2356-2361.
- Qi, M.; Hettiarachchy, N.S., and Kalapathy, U. 1997. **Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin.** J. Food Sci. 62(6):1110-1115.
- Reddy, N.R., and Pierson, M.D. 1987. **Isolation and partial characterization of phytic acid-rich particles from Great Northern beans (*Phaseolus vulgaris* L.).** J. Food Sci. 52(1):109-112.
- Reddy, N.R., and Salunkhe, D.K. 1981. **Interaction between phytate, protein, and minerals in whey fractions of black gram.** J. Food Sci. 46:564-567.



- Reddy, N.R.; Sathe, S.K., and Pierson, M.D. 1988. **Removal of phytate from Great Northern beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and its combined density fraction.** J. Food Sci. 53(1):107-110.
- Rocas, A.N. 1990. **Arboles y arbustos útiles de México-Naturales e Introducidos-**. Edit. Limusa. México. p. 146.
- Saeed, M. and Cheryan, M. 1988. **Sunflower protein concentrates and isolates low in polyphenoles and phytate.** J. Food Sci. 53(4):1127-1131.
- Santos, C.; Ferreira, R.B. and Teixeira, A.R. 1997. **Seed proteins of *Lupinus mutabilis*.** J. Agric. Food Chem. 45(10):3821-3825.
- Sathe, S.K. and Salunkhe, D.K. 1981. **Functional properties of the Great Northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: Emulsion, foaming, viscosity, and gelation properties.** J. Food Sci. 46:71-75.
- Sathe, S.K.; Desphande, S.S., and Salunkhe, D.K. 1982a. **Functional properties of lupin seed (*Lupinus mutabilis*) proteins and protein concentrates.** J. Food Sci. 47:491-497.
- Sathe, S.K.; Desphande, S.S., and Salunkhe, D.K. 1982b. **Functional properties of winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC] proteins.** J. Food Sci. 47:503-509.
- Sauvaire, Y.D.; Baccou, J.F., and Kobrehel, K. 1984. **Solubilization and characterization of fenugreek seed proteins.** J. Agric. Food Chem. 32(1):41-47.
- Schleif, R.F. and Wensink, P.C. 1981. **Practical Methods in Molecular Biology.** Springer-verlag. New York, USA. pp. 75-76.
- Sethi, P. and Kulkarni, P.R. 1993. **Fractionitation of leucaena seed-kernel proteins based on their solubility characteristics.** Food Chemistry. 48:173-177.

- Sigma Chemical Company. 1984. **Nondenatured protein molecular weight marker kit**. Bulletin Technical No. MKR-137. St. Louis, Mo., USA. pp. 1-8.
- Singhal, R.S. and Kulkarni, P.R. 1991. **Puffing effects on functional properties of *Amaranthus paniculatas* (Rajgeera) seed flour**. J. Food Sci. 56(4):1121-1122.
- Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R., and Añón, M.C. 1995. **Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions**. J. Agric. Food Chem. 43(9):2471-2479.
- Sosulski, F.W. and McCurdy, A.R. 1987. **Functionality of flours, protein fractions and isolates from field peas and faba bean**. J. Food Sci. 52(4):1010-1014.
- Sumner, A.K.; Nielsen, M.A., and Youngs, C.G. 1981. **Production and evaluation of pea protein isolate**. J. Food Sci. 46:364-366.
- Swamylingappa, B. and Srinivas, H. 1994. **Preparation and properties of protein isolate from hexane-acetic acid treated commercial soybean meal**. J. Agric. Food Chem. 42:2907-2911.
- Thanh, V.H. and Shibasaki, K. 1976. **Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization**. J. Agric. Food Chem. 24:1117-1121.
- Tjahjedi, C.; Lin, S., and Breene, W.M. 1988. **Isolation and characterization of adzuki bean (*Vigna angularis* cv Takara) proteins**. J. Food Sci. 53(5):1438-1443.
- Vani, B. and Zayas, J.F. 1995. **Foaming properties of selected plant and animal proteins**. J. Food Sci. 60(5):1025-1028.

- Vires, R.A. 1986. **Trees, shrubs, and woods vines of the southwest.** University Texas Press. Austin, Texas, USA. p. 514.
- Wang, C.R. and Zayas, J.F. 1992. **Emulsifying capacity and emulsion stability of soy proteins compared with corn germ protein flour.** J. Food Sci. 57(3):726-731.
- Wang, X.; Warkentin, T.D.; Briggs, C.J.; Oomah, B.D.; Campbell, C.G., and Woods, S. 1998. **Trypsin inhibitor activity in field pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.).** J. Agric. Food Chem. 46(7):2620-2623.
- Xu, L. and Diosady, L.L. 1994. **Functional properties of chinese rapeseed protein isolates.** J. Food Sci. 59(5):1127-1130.
- Yildirim, M.; Hettiarachchy, N.S., and Kalapathy, U. 1996. **Properties of biopolymers from cross-linking whey protein isolate and soybean 11S globulin.** J. Food Sci. 61(6):1129-1131.

# APÉNDICE A

RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Y

CÁLCULOS MATEMÁTICOS

**Tabla 1A.-** Valores F, calculados mediante el análisis de varianza de una sola vía aplicado a la determinación de la composición proximal de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

FUENTE	PROTEÍNAS	GRASA	FIBRA	CENIZAS	HUMEDAD	LIBRE DE NITRÓGENO
ENTRE TRATAMIENTOS <sup>1/</sup>	623.485**	3912.813**	0.276*	97.012**	1.124*	30.843**

<sup>1/</sup> Dos tratamientos: Semilla sin desgrasar y desgrasada.

\*\* Altamente significativo (P<0.01).

\* No significativo (P>0.05).

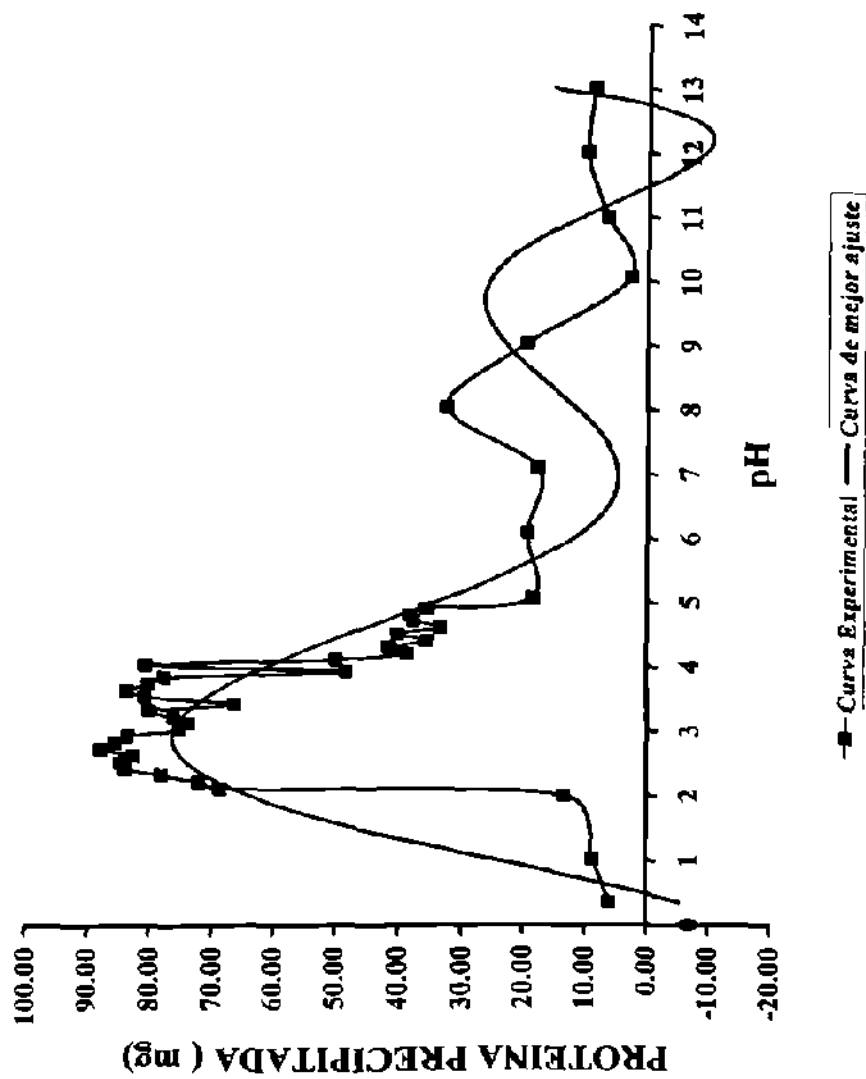
**Tabla 2A.-** Valores F, calculados mediante el análisis de varianza de una vía, aplicado a la determinación de las fracciones proteicas en la harina desgrasada de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – por dos métodos analíticos (Espectrofotométrico y Kjeldahl).

FUENTE	ALBÚMINAS	GLOBULINAS	GLUTELINAS	PROLAMINAS
ENTRE MÉTODOS	28.0530**	16.5342**	6.3968*	3.7736 <sup>1/</sup>

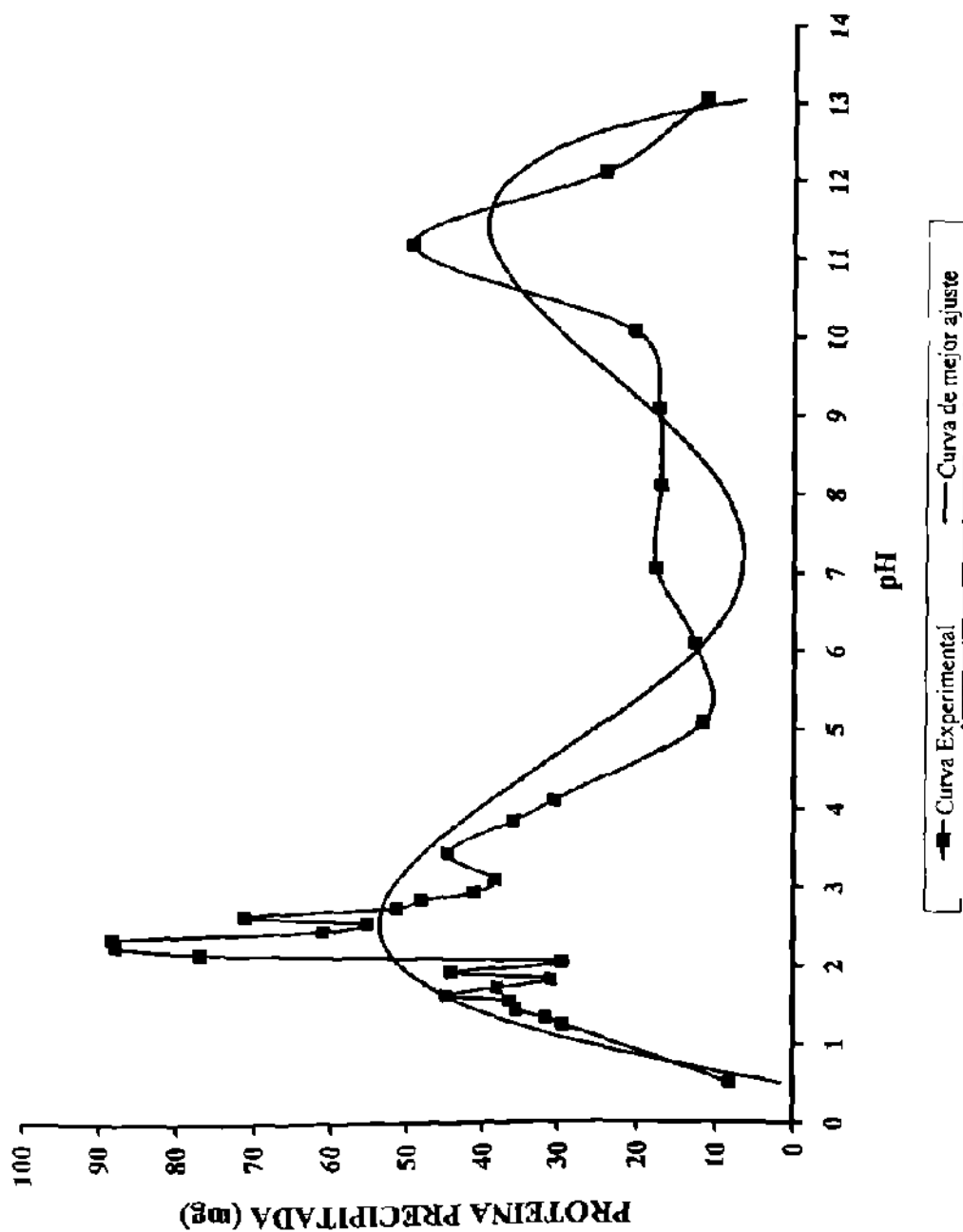
\*\* Altamente significativo (P<0.01).

\* Significativo (P<0.05).

<sup>1/</sup> No significativo (P>>0.05).

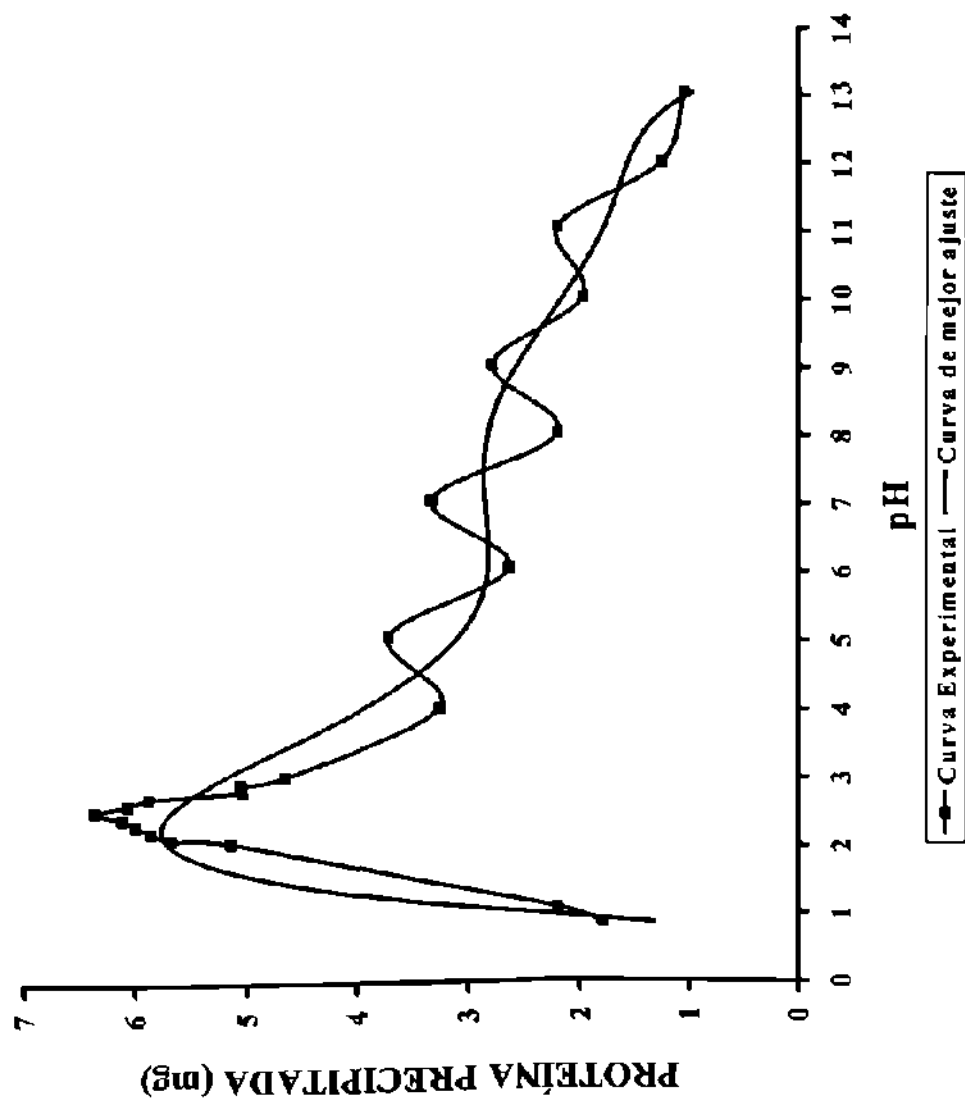


**Figura 1A.-** Curva de mejor ajuste para la regresión no lineal entre el pH y la cantidad de proteína precipitada en la determinación de los puntos isoelectrónicos de las albúminas de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.



**Figura 2A.-** Curva de mejor ajuste para la regresión no lineal entre el pH y la cantidad de proteína precipitada en la determinación de los puntos isoelectrónicos de las globulinas de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

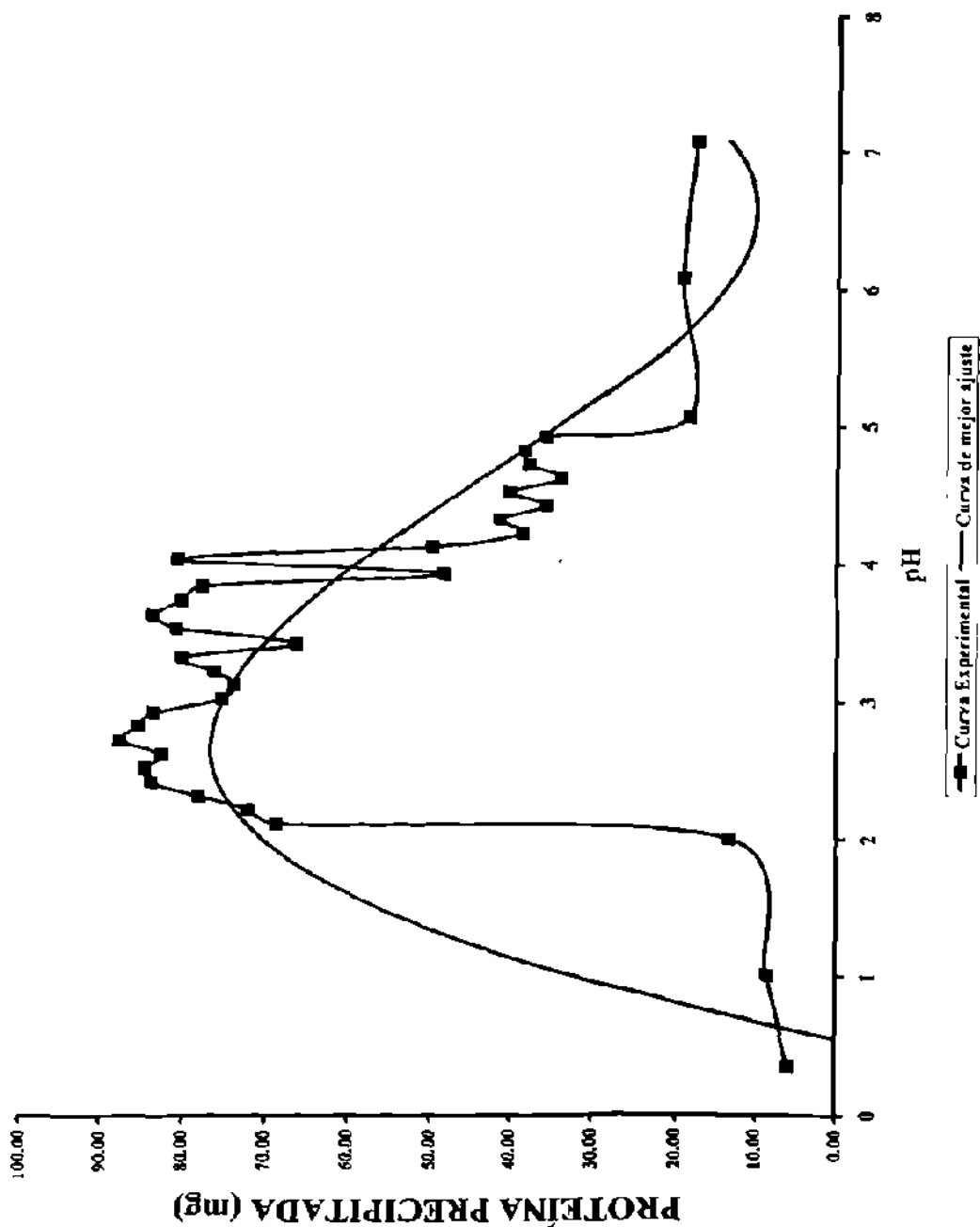




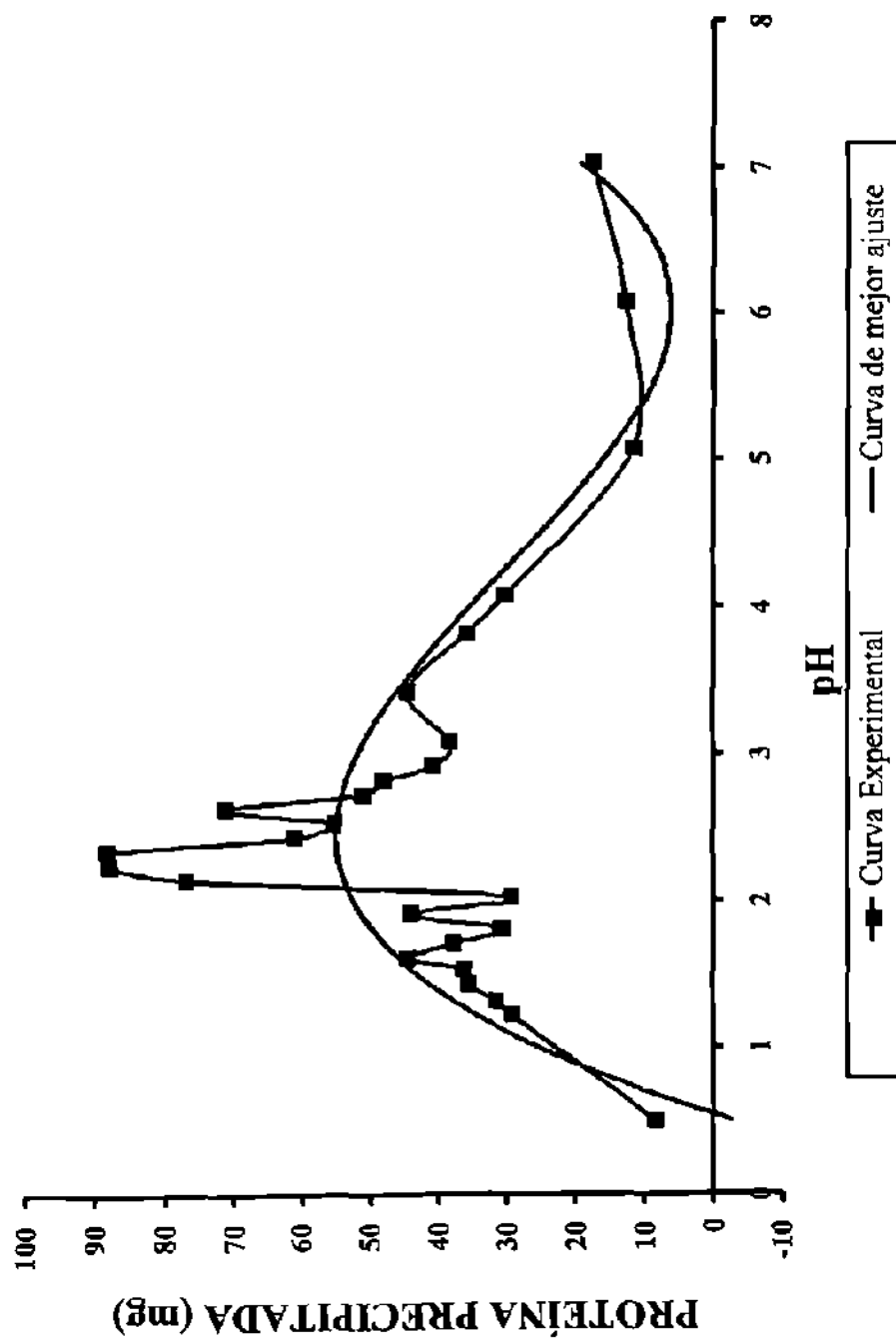
**Figura 3A.-** Curva de mejor ajuste para la regresión no lineal entre el pH y la cantidad de proteína precipitada en la determinación de los puntos isoelectrónicos de las glutelinas de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

**Tabla 3A.-** Ecuaciones ajustadas de regresión no lineal y coeficientes de determinación ( $R^2$ ) para la cantidad de proteína precipitada en función del pH en la determinación de los puntos isoelectrónicos de las principales fracciones proteicas de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

FRACCIÓN PROTEICA	ECUACIÓN	$R^2$
ALBÚMINAS	$Y = 0.0061x^6 - 0.2303x^5 + 3.1688x^4 - 18.5970x^3 + 37.0720x^2 + 18.3130x - 15.5930$	0.7770
GLOBULINAS	$Y = 0.0010x^6 - 0.0328x^5 + 0.2855x^4 + 1.0564x^3 - 24.0410x^2 + 87.5580x - 38.9110$	0.6099
GLUTELINAS	$Y = -0.0002x^6 + 0.0109x^5 - 0.2040x^4 + 1.9048x^3 - 9.1051x^2 + 19.9810x - 10.1620$	0.9381



**Figura 4A.-** Curva de mejor ajuste para la regresión no lineal entre el pH (rango ácido) y la cantidad de proteína precipitada en la determinación de los puntos isoelectrónicos en albúminas de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.



**Figura 5A.-** Curva de mejor ajuste para la regresión no lineal entre el pH (rango ácido) y la cantidad de proteína precipitada en la determinación de los puntos isoeléctricos de las globulinas de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

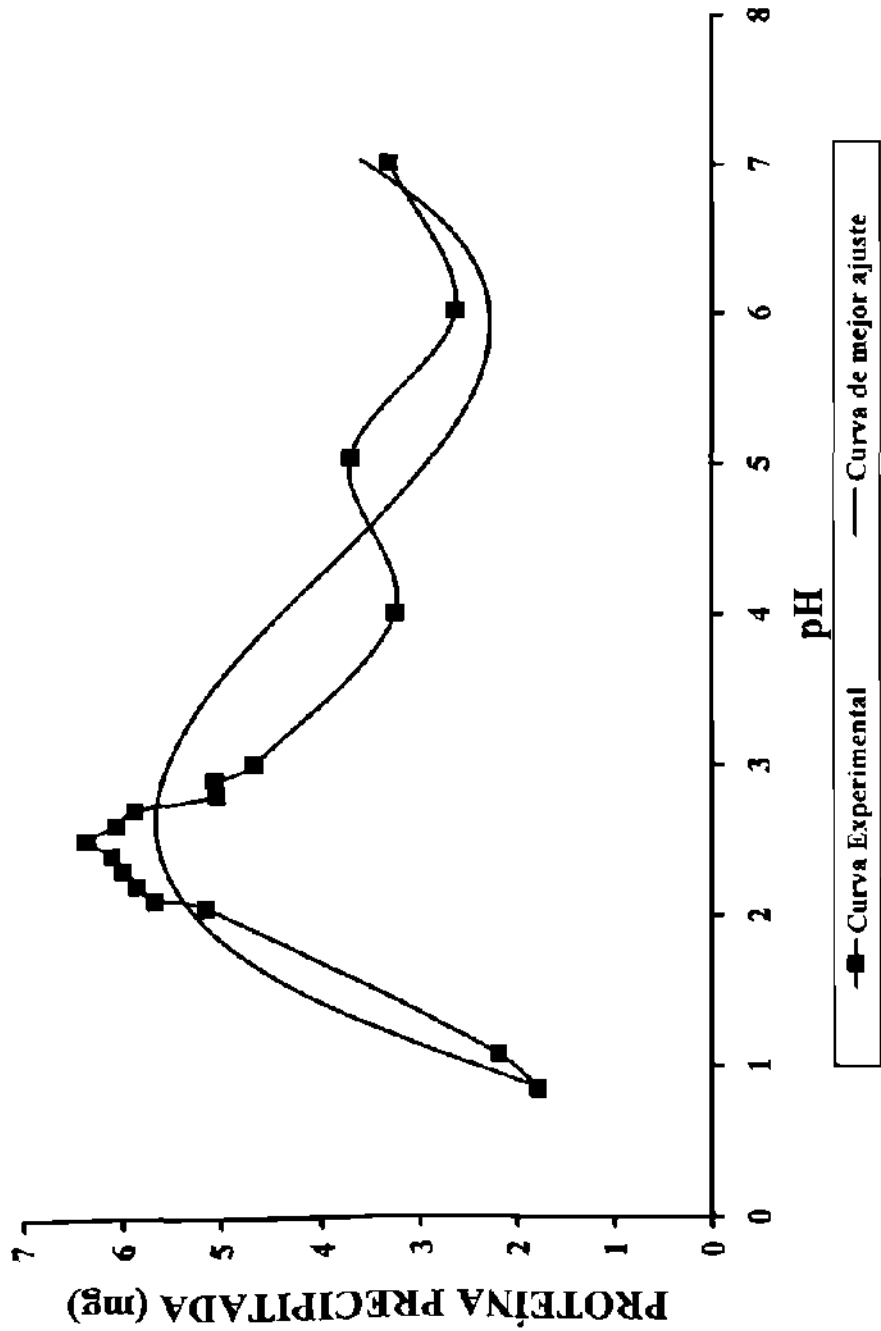


Figura 6A.- Curva de mejor ajuste para la regresión no lineal entre el pH (rango ácido) y la

cantidad de proteína precipitada en la determinación de los puntos isoelectrónicos

en glutelinas de la semilla de ébano - *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

**Tabla 4A.-** Ecuaciones ajustadas de regresión no lineal y coeficientes de determinación ( $R^2$ ) para la cantidad de proteína precipitada en función de valores de pH, comprendidos dentro del rango ácido de la escala de pH (0 – 7), en la determinación de los puntos isoelectrónicos de las principales fracciones proteicas de la semilla madura de ébano.

FRACCIÓN PROTEICA	ECUACIÓN	$R^2$
ALBÚMINAS	$Y = 2.1803X^3 - 30.1690X^2 + 113.8300X - 53.6830$	0.6929
GLOBULINAS	$Y = 2.1273X^3 - 26.9680X^2 + 93.4590X - 43.3380$	0.5735
GLUTELINAS	$Y = 0.1857X^3 - 2.3832X^2 + 8.6651X - 4.0170$	0.8544

**Tabla 5A.-** Valores F calculados mediante el análisis de varianza de dos factores (pH y temperatura) aplicado a la extracción de proteínas de la harina desgrasada de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) -.

FUENTE DE VARIACIÓN	VALOR F
PH	4085.93**
TEMPERATURA	3933.32**
INTERACCIÓN	73.15**

\*\* Altamente significativo (P<0.01).

**Tabla 6A.-** Valores F calculados mediante el análisis de varianza del factor pH y resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, aplicada a la extracción de proteínas de la harina desgrasada de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – a tres temperaturas diferentes.

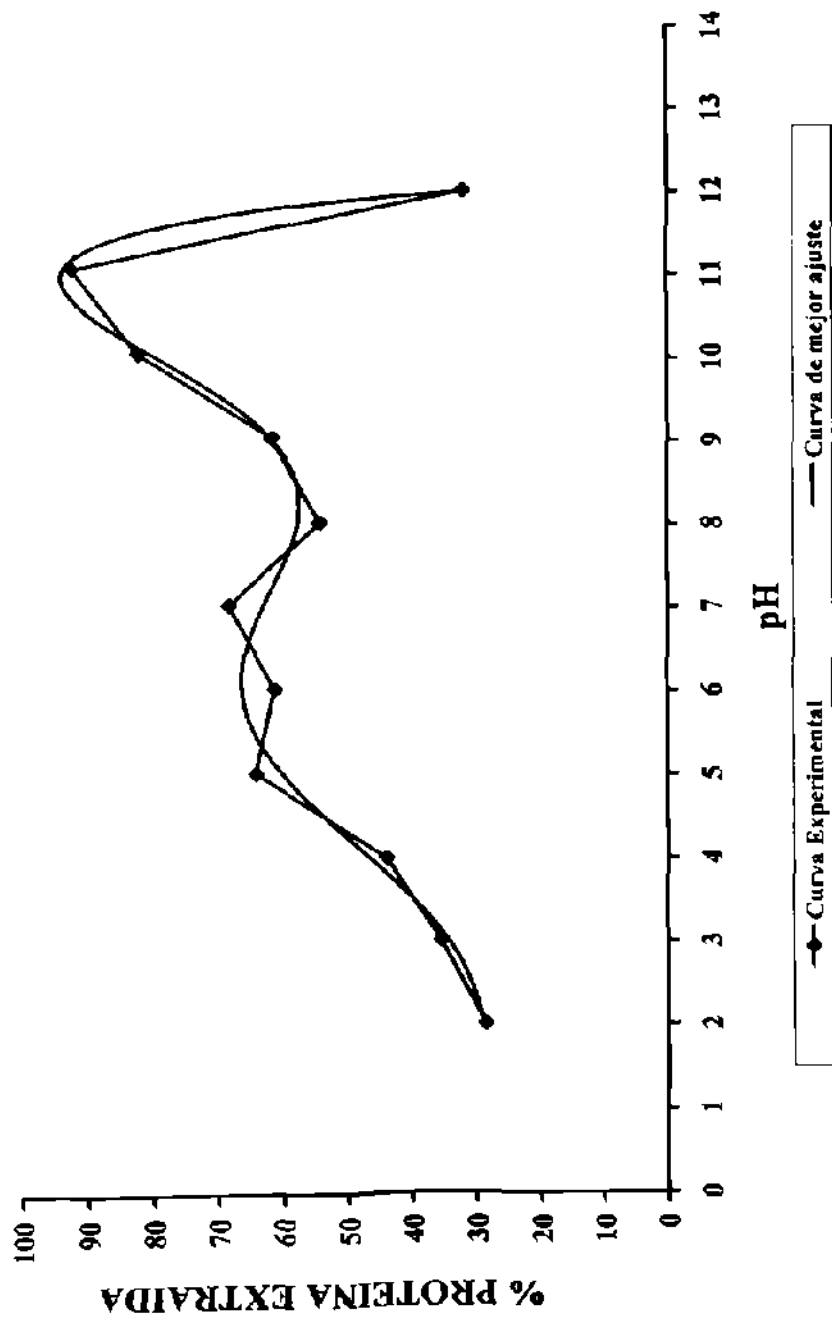
FUENTE	25°C	30°C	35°C
ENTRE VALORES DE pH <sup>1/</sup>	1366.77**	1314.87**	1644.91**
COMPARACIONES <sup>2/</sup>	2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 a b c d e f g e h i j	2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 a b c d c e f g h i b	2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 a b c d d e f d g h i

\*\*Altamente significativo (P<0.01).

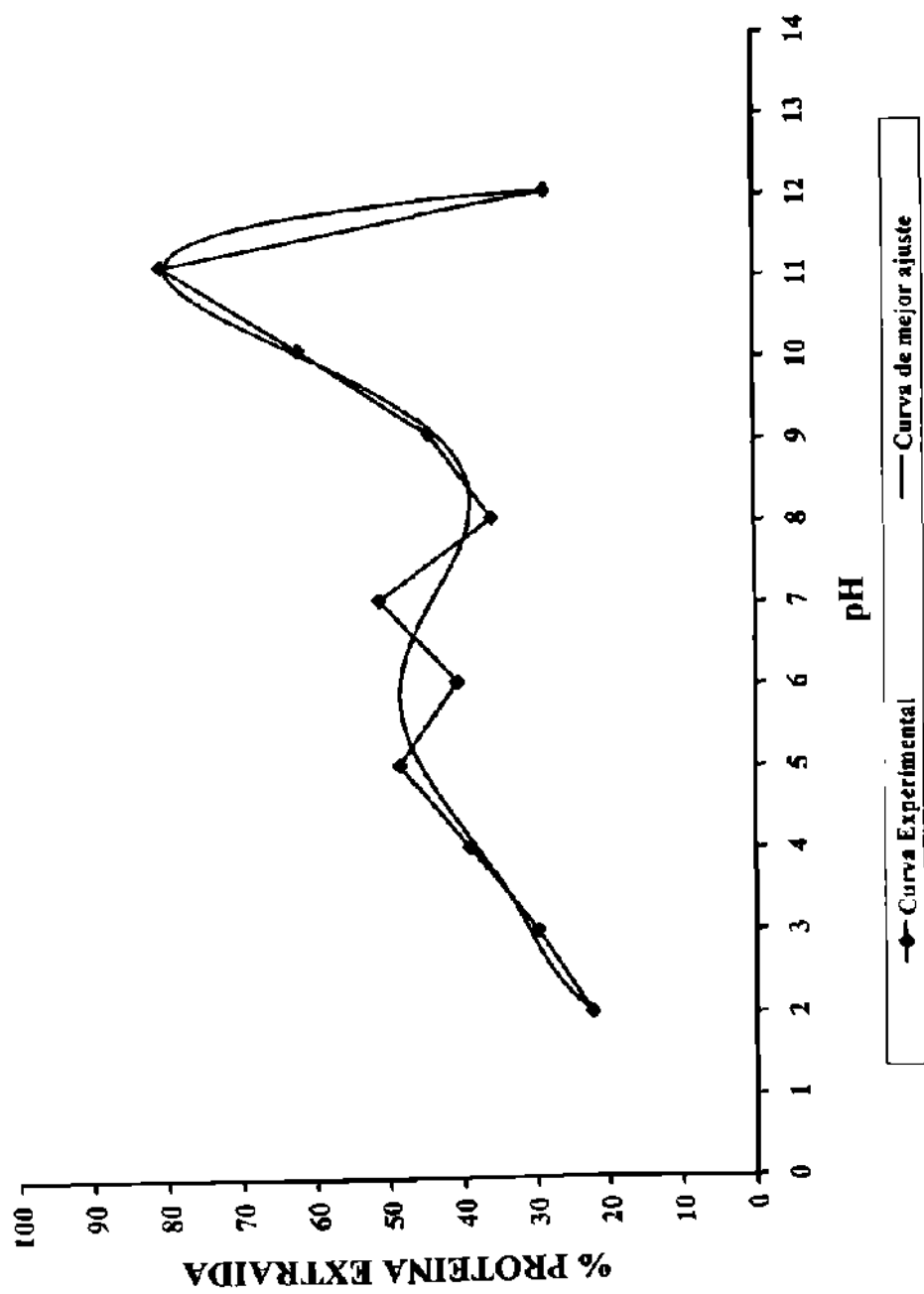
<sup>1/</sup> Valores de pH comprendidos entre 2 y 12.

<sup>2/</sup> Dos valores de pH señalados con la misma letra en las comparaciones múltiples significa que son homogéneas en la cantidad de proteína extraída.

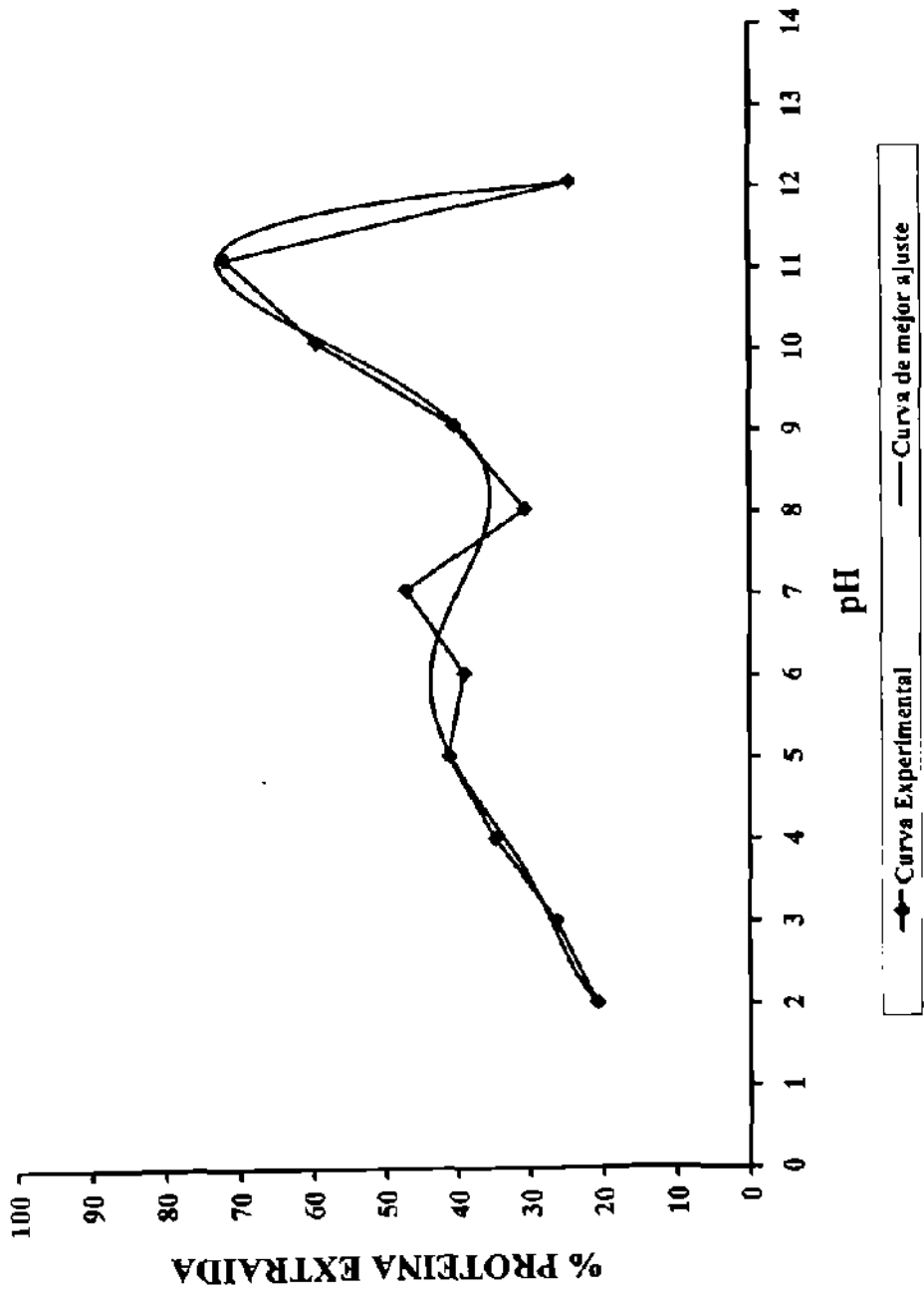




**Figura 7A.-** Curva de mejor ajuste para la regresión no lineal entre el pH y la cantidad de proteína extraída de la semilla madura de ébano a 25°C.



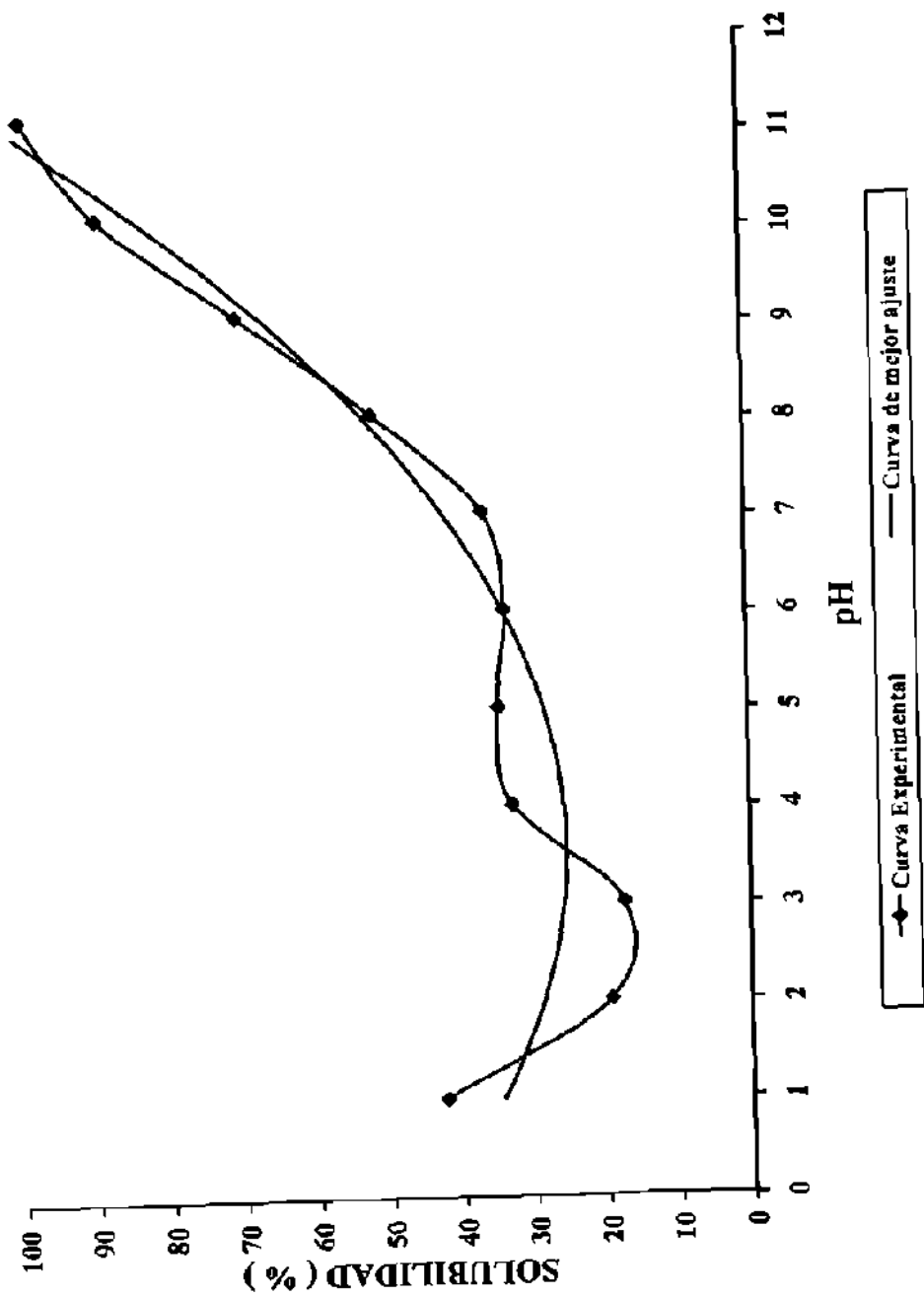
**Figura 8A.-** Curva de mejor ajuste para la regresión no lineal entre el pH y la cantidad de proteína extraída de la semilla madura de ébano a 30°C.



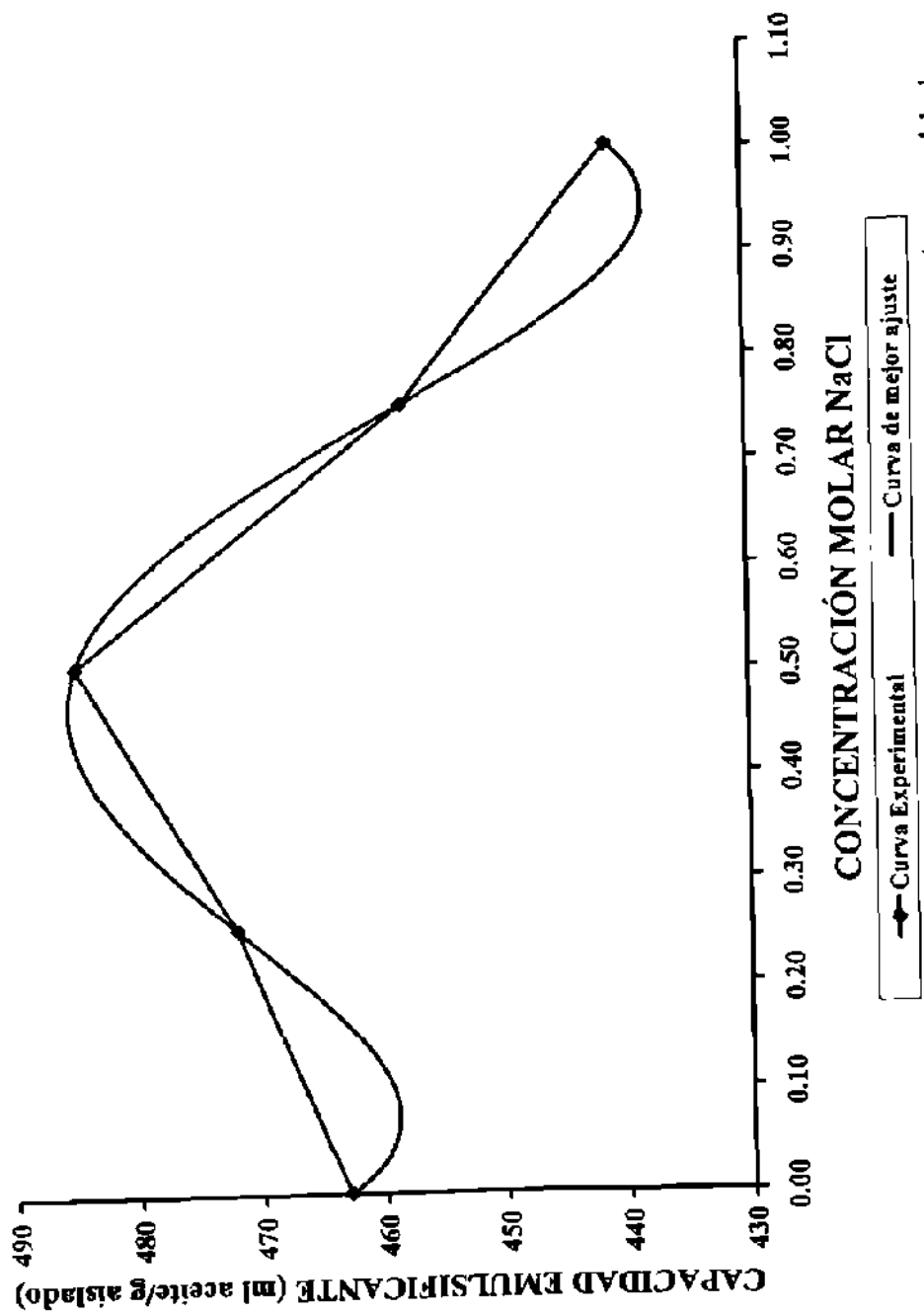
**Figura 9A.-** Curva de mejor ajuste para la regresión no lineal entre el pH y la cantidad de proteína extraída de la semilla madura de ébano a 35°C.

**Tabla 7A.-** Ecuaciones ajustadas de regresión no lineal y coeficientes de determinación ( $R^2$ ) para la cantidad de proteína extraída de la harina desgrasada de la semilla madura de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – en función del pH, a tres temperaturas diferentes.

T (°C)	ECUACIÓN	$R^2$
25	$Y = -0.0094X^6 + 0.3306X^5 - 4.4092X^4 + 27.9960X^3 - 87.4910X^2 + 134.12X - 52.8550$	0.9777
30	$Y = -0.0101X^6 + 0.3670X^5 - 5.1982X^4 + 36.4370X^3 - 133.8900X^2 + 253.1800X - 168.1200$	0.9521
35	$Y = -0.0090X^6 + 0.3250X^5 - 4.5570X^4 + 31.4630X^3 - 112.9800X^2 + 207.1300X - 130.2700$	0.9565



**Figura 10A.-** Curva de mejor ajuste de la regresión no lineal entre la solubilidad del aislado proteico de la semilla de ébano y el pH.



**Figura 11A.-** Curva de mejor ajuste para la regresión no lineal entre la capacidad emulsificante del aislado proteico de la semilla de ébano y la concentración de NaCl.

**Tabla 8A.-** Ecuación ajustada de regresión no lineal y coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para la solubilidad del aislado proteico de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – en función del pH.

ECUACIÓN	$R^2$
$Y = 1.4089X^2 - 10.0090X + 43.0700$	0.9454

**Tabla 9A.-** Ecuación ajustada de regresión no lineal y coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para la capacidad emulsificante del aislado proteico de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – en función de la concentración molar de NaCl.

ECUACIÓN	$R^2$
$Y = 1002.7X^4 - 1973.3X^3 + 1073.3X^2 - 124.67X + 463$	1

**CÁLCULO DIFERENCIAL DE PUNTOS ISOELÉCTRICOS DE LAS  
FRACCIONES PROTEICAS PRINCIPALES DE LA SEMILLA DE  
ÉBANO.**

**ALBÚMINAS**

$$Y = 2.1803X^3 - 30.169X^2 + 113.83X - 53.683$$

$$dy/dx = 3(2.1803)X^2 - 2(30.169)X + 113.83$$

$$dy/dx = 6.5409X^2 - 60.338X + 113.83$$

$$dy/dx = 0 \quad \Leftrightarrow \quad 6.5409X^2 - 60.338X + 113.83 = 0$$

$$X = 2.64$$

**GLOBULINAS**

$$Y = 2.1273X^3 - 26.968X^2 + 93.459X - 43.338$$

$$dy/dx = 3(2.1273)X^2 - 2(26.968)X + 93.459$$

$$dy/dx = 6.3819X^2 - 53.936X + 93.459$$

$$dy/dx = 0 \quad \Leftrightarrow \quad 6.3819X^2 - 53.936X + 93.459 = 0$$

$$X = 2.43$$



## GLUTELINAS

$$Y = 0.1857X^3 - 2.3832169X^2 + 8.665183X - 4.017$$

$$dy/dx = 3(0.1857)X^2 - 2(2.3832)X + 8.6651$$

$$dy/dx = 0.5571X^2 - 4.7664X + 8.6651$$

$$dy/dx = 0 \quad \Leftrightarrow \quad 0.5571X^2 - 4.7664X + 8.665183 = 0$$

$$X = 2.62$$

## APÉNDICE B

- RESULTADOS DE ALGUNAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS
- PATRÓN DE REFERENCIA DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES
- ALGUNAS ECUACIONES UTILIZADAS EN LOS CÁLCULOS

**Tabla 1B.-** Cantidad de proteína precipitada en la fracción albumínica de la harina desgrasada de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – a diferentes valores de pH.

pH	PROTEÍNA PRECIPITADA <sup>M</sup>	
	(mg) <sup>N</sup>	(%)
0.30	6.00 ± 0.36	6.39 ± 0.39
1.00	8.63 ± 0.55	9.19 ± 0.59
2.00	13.43 ± 0.36	14.30 ± 0.46
2.10	68.78 ± 0.73	73.22 ± 0.78
2.20	72.15 ± 0.62	76.80 ± 0.66
2.30	78.08 ± 0.85	83.12 ± 0.91
2.40	83.96 ± 0.47	89.38 ± 0.50
2.50	84.71 ± 0.68	90.17 ± 0.72
2.60	82.58 ± 0.93	87.91 ± 0.98
2.70	87.75 ± 0.34	93.41 ± 0.36
2.80	85.50 ± 0.81	91.02 ± 0.87
2.90	83.66 ± 0.78	89.06 ± 0.99
3.00	75.38 ± 0.74	80.24 ± 0.78
3.10	73.80 ± 0.88	78.56 ± 0.93
3.20	76.24 ± 0.57	81.16 ± 0.60
3.30	80.18 ± 0.82	85.35 ± 0.88
3.40	66.49 ± 0.92	70.78 ± 0.98
3.50	80.93 ± 0.83	86.15 ± 0.88
3.60	83.74 ± 0.75	89.14 ± 0.80
3.70	80.33 ± 0.45	85.51 ± 0.48
3.80	77.81 ± 0.97	82.83 ± 1.03
3.90	48.41 ± 0.46	51.53 ± 0.49
4.00	80.86 ± 0.36	86.08 ± 0.39
4.10	49.95 ± 0.12	53.17 ± 0.19
4.20	38.66 ± 0.99	41.15 ± 1.02
4.30	41.40 ± 0.69	44.07 ± 0.73
4.40	35.66 ± 0.23	37.96 ± 0.24
4.50	40.23 ± 0.87	42.83 ± 0.92
4.60	33.60 ± 0.46	35.77 ± 0.50
4.70	37.76 ± 0.93	40.20 ± 0.98
4.80	38.32 ± 0.72	40.79 ± 0.77
4.90	35.70 ± 0.94	38.00 ± 0.99
5.00	18.57 ± 0.97	19.77 ± 1.01
6.00	19.43 ± 0.56	20.68 ± 0.60
7.00	17.71 ± 0.95	18.85 ± 0.99
8.00	32.59 ± 0.96	34.69 ± 1.00
9.00	19.66 ± 0.97	20.93 ± 1.01
10.00	2.85 ± 0.32	3.03 ± 0.35
11.00	6.75 ± 0.19	7.19 ± 0.21
12.00	9.90 ± 0.87	10.54 ± 0.93
13.00	8.70 ± 0.74	9.26 ± 0.79

<sup>M</sup> Valores promedios de tres determinaciones ± desviación estándar.

<sup>N</sup> Cantidad precipitada de 25 ml de la fracción albumínica.

**Tabla 2B.-** Cantidad de proteína precipitada en la fracción globulínica de la harina desgrasada de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – a diferentes valores de pH.

Ph	PROTEÍNA PRECIPITADA <sup>1/</sup>	
	(mg) <sup>2/</sup>	(%)
0.50	8.29 ± 0.28	9.21 ± 0.31
1.20	29.36 ± 0.62	32.62 ± 0.69
1.30	31.65 ± 0.58	35.17 ± 0.65
1.40	35.63 ± 0.75	39.59 ± 0.83
1.50	36.38 ± 0.65	40.42 ± 0.72
1.60	44.81 ± 0.57	49.79 ± 0.63
1.70	38.07 ± 0.95	42.30 ± 1.06
1.80	30.94 ± 0.30	34.38 ± 0.33
1.90	44.22 ± 0.49	49.13 ± 0.55
2.00	29.44 ± 0.83	32.71 ± 0.92
2.10	76.99 ± 0.53	85.54 ± 0.59
2.20	87.90 ± 0.28	97.67 ± 0.31
2.30	88.31 ± 0.39	98.12 ± 0.57
2.40	61.05 ± 0.51	67.83 ± 0.56
2.50	55.43 ± 0.34	61.59 ± 0.38
2.60	71.36 ± 0.33	79.29 ± 0.36
2.70	51.41 ± 0.70	57.12 ± 0.78
2.80	48.19 ± 0.45	53.54 ± 0.45
2.90	41.06 ± 0.81	45.62 ± 0.89
3.00	38.36 ± 0.67	42.62 ± 0.75
3.40	44.70 ± 0.73	49.67 ± 0.81
3.80	35.96 ± 0.55	39.36 ± 0.60
4.00	30.41 ± 0.28	33.79 ± 0.31
5.00	11.59 ± 0.49	12.88 ± 0.55
6.00	12.64 ± 0.45	14.04 ± 0.50
7.00	17.47 ± 0.62	19.41 ± 0.69
8.00	16.91 ± 0.92	18.97 ± 1.01
9.00	17.10 ± 1.08	19.00 ± 1.21
10.00	20.25 ± 1.03	22.50 ± 1.15
11.00	49.38 ± 0.39	54.87 ± 0.43
12.00	23.88 ± 0.62	26.53 ± 0.69
13.00	11.25 ± 0.22	12.50 ± 0.25

<sup>1/</sup> Valores promedios de tres determinaciones ± desviación estándar.

<sup>2/</sup> Cantidad precipitada de 25 ml de la fracción globulínica.

**Tabla 3B.-** Cantidad de proteína precipitada en la fracción glutelínica de la harina desgrasada de la semilla de ébano – *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) – a diferentes valores de pH.

PH	PROTEÍNA PRECIPITADA <sup>1/</sup>	
	(mg) <sup>2/</sup>	(%)
0.80	1.79 ± 0.18	26.02 ± 2.68
1.00	2.20 ± 0.13	31.98 ± 1.95
2.00	5.15 ± 0.20	74.85 ± 2.89
2.10	5.68 ± 0.19	82.56 ± 2.80
2.20	5.86 ± 0.17	85.17 ± 2.58
2.30	6.00 ± 0.16	87.21 ± 2.29
2.40	6.12 ± 0.16	88.95 ± 2.35
2.50	6.37 ± 0.11	92.59 ± 1.60
2.60	6.07 ± 0.14	88.23 ± 2.12
2.70	5.88 ± 0.17	85.47 ± 2.56
2.80	5.04 ± 0.21	73.26 ± 1.07
2.90	5.06 ± 0.24	73.55 ± 1.50
3.00	4.66 ± 0.19	67.73 ± 2.82
4.00	3.25 ± 0.32	47.24 ± 2.71
5.00	3.71 ± 0.40	53.92 ± 2.98
6.00	2.64 ± 0.48	38.37 ± 1.93
7.00	3.32 ± 0.38	48.26 ± 2.58
8.00	2.20 ± 0.25	31.98 ± 1.59
9.00	2.79 ± 0.13	40.55 ± 1.84
10.00	1.97 ± 0.12	28.63 ± 1.75
11.00	2.20 ± 0.15	31.98 ± 2.11
12.00	1.25 ± 0.11	18.17 ± 1.65
13.00	1.04 ± 0.09	15.12 ± 1.43

<sup>1/</sup> Valor promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

<sup>2/</sup> Cantidad precipitada de 25 ml de la fracción glutelínica.

**Tabla 4B.- Patrón de referencia de requerimientos de aminoácidos esenciales.**

AMINOÁCIDO ESENCIAL (mg/g proteína)	PATRÓN FAO/OMS/UNU 1991 <sup>U</sup> (para niños pre-escolares)
ISOLEUCINA	28
LEUCINA	66
LISINA	58
METIONINA+CISTINA	25
FENILALANINA+TIROSINA	63
TREONINA	34
TRIPTOFANO	10
VALINA	35
HISTIDINA	19

<sup>U</sup> Citado por Alanís-Guzmán (1995).

## ALGUNAS ECUACIONES UTILIZADAS EN LOS CÁLCULOS

### 1.- Conversión de Absorbancias a Concentración Proteica (mg/ml)

$$\text{Concentración proteica} = 1.5 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260} \quad (\text{Schleif y Wensink, 1981})$$

(mg/ml)

$A_{280}$  = absorbancias a 280 nm.

$A_{260}$  = absorbancias a 260 nm.

### 2.- Propiedades Funcionales:

$$\text{Solubilidad}(\%) = \frac{\text{Cantidad de N. en el sobrenadante}}{\text{Cantidad de N. en la muestra}} \times 100$$

$$\text{Absorción de agua}(\%) = \frac{\text{Peso de agua absorbida (g)}}{\text{Peso de muestra seca (g)}} \times 100$$

$$\text{Absorción de aceite}(\%) = \frac{\text{Peso de aceite absorbido (g)}}{\text{Peso de muestra seca (g)}} \times 100$$

$$\text{Capacidad espumante}(\%) = \frac{\text{Volumen después del batido} - \text{Volumen antes del batido}}{\text{Volumen antes del batido}} \times 100$$





