

R-12664

T 970

85

5

24 FEB. 1998

Alvaro Laffitte

**LIPIDOS ASOCIADOS A LAS PROTEINAS DEL
GARBANZO. MODIFICACION DE SUS
PROTEINAS CON LIPIDOS OXIDADOS**

Raúl Sánchez Vioque

Sevilla, 1998

LOS 1064388

LIPIDOS ASOCIADOS A LAS PROTEINAS DEL
GARBANZO. MODIFICACION DE SUS PROTEINAS CON
LIPIDOS OXIDADOS

Memoria presentada por el licenciado
Raúl Sánchez Vioque para optar al
grado de doctor en Farmacia

Raúl Sánchez

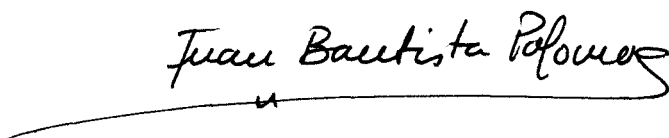
Sevilla, 1998

LIPIDOS ASOCIADOS A LAS PROTEINAS DEL
GARBANZO. MODIFICACION DE SUS PROTEINAS CON
LIPIDOS OXIDADOS

Vº Bº
Los directores de la Tesis



Fdo.: Dr. Francisco Millán Rodríguez
Colaborador Científico del
Departamento de Fisiología y
Tecnología de Productos Vegetales
del Instituto de la Grasa (C.S.I.C.).



Fdo.: Dr. Juan Bautista Palomas
Profesor Titular del Departamento
de Bioquímica, Bromatología y
Toxicología de la Facultad de
Farmacia de la Universidad de
Sevilla.



Fdo.: Dr. Luis Carlos Alonso Arnedo
Director de Koipesol Semillas, S.A.

INDICE

I. INTRODUCCION	7
I.1. El garbanzo como materia prima para la preparación de aislados proteicos	7
I.1.1. Origen e historia del garbanzo	7
I.1.2. Cultivo y producción	9
I.1.3. Composición nutricional de la semilla del garbanzo	11
I.1.4. El garbanzo en la alimentación animal y humana	14
I.1.4.1. Alimentación animal	14
I.1.4.2. Alimentación humana	15
I.2. Aislados proteicos de origen vegetal	18
I.2.1. Preparación	18
I.2.1.1. Obtención de concentrados proteicos	20
I.2.1.2. Obtención de aislados proteicos	25
I.2.2. Usos y aplicaciones de los aislados proteicos	28
I.3. Efecto de los lípidos sobre los aislados proteicos	31
I.3.1. Lípidos asociados a las proteínas	31
I.3.2. Oxidación lipídica	35
I.3.3. Interacción de proteínas con productos de oxidación lipídica	37
I.3.3.1. Interacciones no covalentes	37
I.3.3.2. Interacciones covalentes	38
II. OBJETIVOS	43

III. APARATOS, MATERIALES Y METODOS	45
III.1. Aparatos	45
III.1.1. Cromatografía líquida	45
III.1.2. Cromatografía gaseosa	45
III.1.3. Equipo de electroforesis	46
III.1.4. Determinación del contenido en nitrógeno	46
III.1.5. Espectrofotómetro	46
III.1.6. Centrífuga	46
III.1.7. Otros aparatos	47
III.2. Materiales	48
III.2.1. Material vegetal	48
III.2.2. Kit de calibración para filtración en gel	48
III.2.3. Kit de calibración para electroforesis	48
III.2.4. Aminoácidos	48
III.2.5. Concentradores de proteínas	49
III.2.6. Columnas PD-10 Sephadex G-25M	49
III.2.7. Enzimas usados en la digestibilidad proteica <i>in vitro</i>	49
III.2.8. Enzimas usados en la determinación del contenido de fibra total	49
III.2.9. Cromatografía en capa fina	50
III.2.10. Patrones usados en cromatografía en capa fina	50
III.2.11. Patrones usados en cromatografía gaseosa	50
III.2.12. Otros productos	51
III.3. Métodos	52
III.3.1. Determinación cuantitativa de proteínas	52
III.3.2. Determinación del contenido de nitrógeno	54
III.3.3. Humedad y cenizas	55

III.3.4. Fibra total	56
III.3.5. Sólidos disueltos, azúcares solubles y polifenoles	56
III.3.6. Solubilidad proteica	57
III.3.7. Absorción de agua y grasa. Capacidad emulsionante	58
III.3.8. Digestibilidad proteica <i>in vitro</i>	60
III.3.9. Estimación de los pesos moleculares de las proteínas mediante cromatografía de filtración en gel	60
III.3.10. Electroforesis	62
III.3.11. Determinación cuantitativa de aminoácidos	64
III.3.12. Harina de garbanzo desengrasada	65
III.3.13. Determinación del punto isoelectrico de las proteínas del garbanzo	65
III.3.14. Obtención de aislados proteicos	65
III.3.15. Clasificación de las proteínas según su solubilidad	67
III.3.16. Extracción y purificación de los lípidos asociados a la harina y los aislados proteicos del garbanzo	69
III.3.17. Reactivos para la detección de lípidos en cromatografía en capa fina	69
III.3.18. Separación e identificación de las distintas clases de lípidos	70
III.3.19. Determinación cuantitativa de las clases de lípidos	73
III.3.20. Análisis de los ácidos grasos	76
III.3.21. Análisis de los esteroides	76
III.3.22. Análisis de los alcoholes grasos	76
III.3.23. Hidrólisis de los glucolípidos	77
III.3.24. Identificación de los azúcares presentes en los glucolípidos	77
III.3.25. Hidrólisis de los fosfolípidos	78
III.3.26. Identificación de los productos de hidrólisis de los fosfolípidos	78
III.3.27. Purificación de la proteína legumín	79
III.3.27.1. Fraccionamiento preliminar	79
III.3.27.2. Intercambio aniónico	79
III.3.27.3. Filtración en gel	80
III.3.28. Incubación proteína-lípido	80
III.3.29. Lisina asimilable	80
III.3.30. Determinación cuantitativa de aminoácidos alterados	81

IV. RESULTADOS Y DISCUSION	84
IV.1. Clasificación de las proteínas del garbanzo según su solubilidad	84
IV.2. Purificación de la proteína legumín	90
IV.3. Obtención y estudio de los aislados proteicos del garbanzo	95
IV.3.1. Rendimiento del proceso	96
IV.3.2. Composición química de los aislados	97
IV.3.3. Propiedades funcionales básicas de los aislados	99
IV.3.4. Caracterización de las proteínas de los aislados	101
IV.3.5. Digestibilidad proteica <i>in vitro</i> de los aislados	104
IV.4. Estudio de los lípidos asociados a las proteínas de los aislados	108
IV.4.1. Separación e identificación de las distintas clases de lípidos	109
IV.4.2. Determinación cuantitativa de las distintas clases de lípidos	111
IV.4.3. Análisis de los ácidos grasos, alcoholes grasos y esteroides de las distintas clases de lípidos	115
IV.5. Estudio de la interacción entre la proteína legumín y los productos de oxidación lipídica del ácido linoleico, la trilinoleína y la fosfatidilcolina	122
IV.5.1. Filtración en gel y electroforesis	122
IV.5.2. Análisis de aminoácidos	127
IV.5.3. Lisina asimilable	129
IV.5.4. Digestibilidad proteica <i>in vitro</i>	130

V. CONCLUSIONES	132
-----------------------	-----

VI. BIBLIOGRAFIA	134
------------------------	-----

ABREVIATURAS

AEDT	Acido etilendiaminotetracético
AGL	Acidos grasos libres
BSA	Albúmina de suero bovino
CCF	Cromatografía en capa fina
CEP	Coeficiente de eficacia proteica
CEPN	Coeficiente de eficacia proteica neta
CG	Cromatografía gaseosa
DAG	Diglicéridos
DGDG	Digalactosildiglicéridos
DTT	1,4-dimercapto-2,3-butanodiol (ditiotreitól)
EG	Esterol glucósidos
EGE	Esterol glucósidos esterificados
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
FC	Fosfatidilcolina
FE	Fosfatidiletanolamina
FI	Fosfatidilinositol
FPLC	Cromatografía líquida rápida para proteínas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
KDa	Kilodalton
MES	Acido 2-(N-morfolin)-etanosulfónico
NSI	Indice de solubilidad del nitrógeno
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pI	Punto isoelectrico
Rf	Movilidad relativa
SDS	Dodecilhidrogenosulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
TAG	Triglicéridos
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TNBS	Acido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico

t_r	Tiempo de retención
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
V_e	Volumen de elución

I. INTRODUCCION

I.1. El garbanzo como materia prima para la preparación de aislados proteicos.

I.1.1. Origen e historia del garbanzo.

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es seguramente originario de la zona sureste de Turquía limítrofe con Siria. Tres especies silvestres muy relacionadas con él se han encontrado en dicha zona.

El nombre *Cicer* probablemente derive de la palabra pre-indogermánica *kickere* utilizada por las tribus antiguas que habitaban en el norte de Grecia. La referencia más antigua de la palabra *arietinum* se encuentra en un trabajo de Columella, probablemente como traducción del griego *krios*, que significa carnero y garbanzo, y que alude a la forma de la semilla, parecida a la cabeza de un carnero (Aries).

La presencia constatada más antigua del garbanzo data del año 5450 a. de C. y procede de la localidad turca de Hacilar. También se ha encontrado, como regalo de tumba, una vasija con garbanzos del 1400 a. de C. en Deir-el-Medineh (Egipto), aunque hay que recordar que la escasa presencia de leguminosas grano en las tumbas egipcias se debe a que los egipcios las consideraban sustancias impuras. En la India, su primera aparición data del año 2000 a. de C. Siendo una planta cultivada entre nosotros desde tiempos remotos, no se conoce la época de su introducción en la Península Ibérica.

Durante el proceso de dispersión que sufrió el cultivo, se produjo la diferenciación de los dos grandes tipos de garbanzos existentes. En la parte occidental se desarrollaron cultivares de tamaño grande, de color claro, rugosos y con forma de cabeza de carnero (tipo *kabuli*). En las zonas del sur (Etiopía) y del este, se desarrollaron cultivares de semillas pequeñas y oscuras (tipo *desi*), menos evolucionadas que los anteriores.

Tanto en Egipto como en la antigua Grecia y Roma, el garbanzo, y en general todas las

leguminosas de grano, servían de alimento a las clases más pobres. Los sacerdotes y estudiantes eran advertidos del peligro de comerlas, ya que se creía que podrían inhibir la claridad de pensamiento y disminuir la riqueza espiritual.

Carlomagno, en su *Capitulare de Villis* (812) hace mención al garbanzo y lo incluye entre aquellas plantas que desearía tener en sus jardines. De igual manera aparece en la mayoría de los herbarios medievales, donde sus auténticas propiedades se mezclan con otras, fruto de creencias populares.

Más recientemente, en el siglo XVI, los españoles y portugueses lo introdujeron en América Central y Sudamérica donde encontró condiciones ambientales favorables para su rápida expansión, sobre todo en México, donde llega a constituir un producto de gran importancia en su balanza comercial.

En 1972, Van der Maesen, recopila la información existente acerca de las propiedades dietéticas y medicinales del garbanzo, en la que se pone de manifiesto cómo la sabiduría popular le atribuía efectos beneficiosos sobre el pensamiento. Con frecuencia se podía encontrar en farmacias y herbarios de toda Europa Central y Occidental.

El cultivo del garbanzo en toda Europa Central y Occidental ha sido extensivo hasta el inicio del presente siglo. En Alemania se produjo la recesión del mismo a finales del siglo pasado. En Austria y Suiza se cultivó hasta el inicio de la Primera Guerra Mundial. En la actualidad, fuera del área mediterránea y de Bulgaria, el cultivo del garbanzo ha acabado convirtiéndose en una reliquia.

Hoy en día, su utilización más generalizada se deriva de la enorme variedad de platos propios de la cocina mediterránea y de la India, país éste donde alcanza una importancia de primera magnitud como principal fuente proteica en la alimentación humana.

I.1.2. Cultivo y producción.

El garbanzo es la segunda leguminosa de grano en importancia del mundo y la primera en la región mediterránea en área cultivada (De Miguel, 1991). Su principal aprovechamiento se deriva de su utilización como alimento humano, preparado de muy diversas formas, de acuerdo con las costumbres de cada país. La calidad de su proteína es considerada equivalente a la de la soja (Friedman, 1996a).

Su área de cultivo comprende zonas situadas entre los 15° y los 40° de latitud norte, sometida a muy diferentes regímenes de temperatura y luz. Actualmente se pueden distinguir cuatro grandes zonas de producción: el subcontinente indio, la Cuenca Mediterránea, América del Sur y África Oriental (Bouchez, 1985). Se cultiva en invierno en la India, Etiopía y Sudamérica y en primavera en la región mediterránea, siendo en general un cultivo de secano, se riega el 10% de la superficie total cultivada. La superficie mundial supera los 10 millones de hectáreas, de las cuales más de 7 millones se concentran en la India (De Miguel, 1991).

La superficie cultivada así como la producción de garbanzos en España durante los últimos años (Junta de Andalucía, 1990-1997), aparece reflejada en la Figura 1. Aunque la superficie dedicada al cultivo ha ido disminuyendo progresivamente, a partir de 1993 se ha producido un notable incremento en la misma, acompañado de un aumento paralelo en la producción, si exceptuamos el año 1995. Ese año el rendimiento fue de 275 Kg de garbanzos por Ha frente a los 754 Kg/Ha, de media, que se obtuvo en los demás años.

Actualmente, en nuestro país, se da la paradoja de contar con una enorme tradición en el cultivo del garbanzo, de producir los de mejor calidad en el mundo y, sin embargo, encabezar junto con Etiopía la lista de países importadores. Las causas que han originado esta situación pueden resumirse en las siguientes:

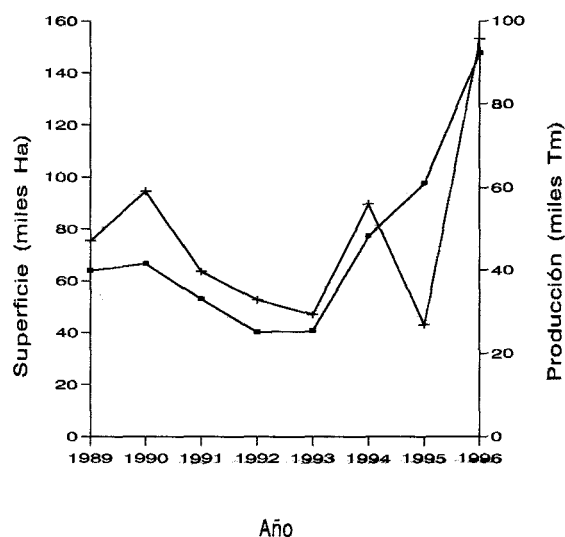


Figura 1. Superficie cultivada (■) y producción (+) de semillas de garbanzo en España durante el periodo 1989-1996.

- La ausencia de variedades tipificadas con altos rendimientos y buenas características para su comercialización.

- La escasa evolución de las técnicas de cultivo, sobre todo en lo que se refiere a la mecanización. No olvidemos los enormes costes que supone la recolección manual.

- La falta de estabilidad en las producciones provocada, básicamente, por las plagas y, sobre todo, por las enfermedades, que causan estragos periódicamente y generan una sensación de inseguridad en los agricultores, que se inclinan hacia la elección de otros cultivos.

- El fuerte desarrollo experimentado en los últimos años por la industria extractora de semillas oleaginosas.

- La ausencia de una política comercial adecuada en este campo (De Miguel, 1991).

I.1.3. Composición nutricional de la semilla del garbanzo.

La semilla de garbanzo es una excelente fuente de hidratos de carbono y proteínas, los cuales constituyen el 80% del peso total seco. El contenido en proteína oscila entre el 12.4 y el 30.6% (Chavan *et al.*, 1986). Además de por su dotación génica, el contenido proteico y su calidad están influidos por varios factores ambientales, como la localización y las prácticas de cultivo. Así se sabe, que el contenido en proteína de la semilla depende de la zona donde se cultiva (Singh *et al.*, 1982a). La aplicación de nitrógeno, fósforo y azufre al cultivo, incrementa considerablemente las proteínas y los aminoácidos en la semilla (Gupta y Singh, 1982).

El almidón es el principal hidrato de carbono del garbanzo. Su contenido en la semilla está comprendido entre el 41.0 y el 50.8%. Los garbanzos tipo kabuli tienen más almidón que los desi. El 20-30% del almidón del garbanzo es amilosa y el resto amilopectina. Los azúcares solubles comprenden el 4.8-8.5% (Lineback y Ke, 1975; Jambunathan y Singh, 1978). Desafortunadamente, el garbanzo presenta un 25.6% de hidratos de carbono no disponibles, el nivel más alto entre las leguminosas consumidas habitualmente en la India (Kamath y Belavady, 1980). Igualmente, la digestibilidad de los mismos es la más baja (Shurpalekar *et al.*, 1979).

El contenido en grasas oscila entre el 4.7 y el 7.9%, siendo linoleico, oleico, y palmítico los ácidos grasos mayoritarios (Sosulski y Gadan, 1988). Los triglicéridos y los fosfolípidos son los lípidos más abundantes, y la lecitina (o fosfatidilcolina) el fosfolípido principal (Ghirardi *et al.*, 1974). Al garbanzo, al igual que a otras leguminosas, se le atribuye un efecto hipocolesterolémico

que podría deberse a su composición en ácidos grasos (Ghirardi *et al.*, 1974) o a la de sus proteínas (Sautier *et al.*, 1986).

El contenido en fibra del garbanzo está directamente relacionado con el porcentaje que representa la cubierta en el total de la semilla. Este porcentaje varía entre un 5.2 y un 19.4% (Jambunathan y Singh, 1978). En términos exclusivamente caloríficos, las semillas tipo kabuli son superiores a las tipo desi debido al menor contenido en fibra de aquellas.

Los mayores contenidos en minerales del garbanzo corresponden al fósforo, potasio y magnesio. También es una buena fuente de hierro y zinc con 2.3 y 1.3 mg por cada gramo de ceniza, respectivamente. Otros minerales como el sodio y el manganeso muestran una gran variedad en su contenido según el cultivo de que se trate (Gattuso *et al.*, 1986).

Si comparamos la composición aminoacídica de la proteína del garbanzo con patrones de referencia, vemos claramente que los aminoácidos azufrados, metionina y cisteína, son los aminoácidos limitantes primarios. Junto a estos aminoácidos, treonina, valina e isoleucina también pueden mostrar índices químicos por debajo de los niveles satisfactorios (Avancini *et al.*, 1992).

En las legumbres de grano, las globulinas constituyen el 55.3-90% de las proteínas totales de la semilla (Guéguen *et al.*, 1996). Las globulinas tienen un alto contenido en aspártico/asparagina, glutámico/glutamina y arginina pero su valor nutritivo es pobre debido a su bajo contenido en aminoácidos azufrados. En cambio, la fracción de albúminas contiene una mayor proporción de aminoácidos azufrados y de lisina (Bhatty, 1982).

Como otras leguminosas, las semillas del garbanzo contienen varias sustancias químicas nocivas para el sistema digestivo humano. Desde hace años se sabe que el valor nutritivo y la digestibilidad proteica de las legumbres crudas son muy bajos debido a los inhibidores de las proteasas y a otros compuestos.

Los inhibidores de las proteasas digestivas tripsina y quimotripsina, se han estudiado ampliamente y sus modos de acción han quedado establecidos. Entre las leguminosas, el garbanzo es una de las que presenta menor capacidad para inhibir a la tripsina (Pak y Barja, 1974). No obstante, los niveles de inhibidores de proteasas varían considerablemente según el genotipo. El inhibidor de la quimotripsina es más termoestable que el inhibidor de la tripsina. Los inhibidores son sólo completamente destruidos cuando se les somete a tratamiento térmico en condiciones ácidas (Sumathi y Pattabiraman, 1976). A pesar de todo, las proteínas de las leguminosas no desarrollan todo su potencial nutritivo ni incluso cocinadas, ya que tanto la digestibilidad de la proteína como la disponibilidad de algunos aminoácidos, especialmente los azufrados, siguen siendo bajos.

Los inhibidores de la amilasa pancreática están presentes en numerosas legumbres, aunque su actividad en las semillas del garbanzo es de las más bajas entre las legumbres habitualmente consumidas (Jaffe, 1973). Los inhibidores de la amilasa del garbanzo se inactivan completamente tras hervirlos durante 10 min (Singh *et al.*, 1982b), y puesto que la mayoría de los garbanzos se consumen cocidos, apenas tienen importancia práctica.

Es bien sabida la capacidad de las leguminosas para producir gas intestinal. La fermentación microbiana en el intestino grueso, con la formación de hidrógeno, metano y dióxido de carbono, es la responsable de este fenómeno. Frecuentemente se ha sugerido que son los oligosacáridos rafinosa, estaquiosa y verbascosa los causantes de la flatulencia. La producción de gas es mayor en el caso del garbanzo que en otras leguminosas debido a su mayor contenido en estos oligosacáridos. Los garbanzos germinados producen menos flatulencia que los no germinados, y esto se debe a que la germinación disminuye los niveles de oligosacáridos. Por contra, el cocinado los incrementa (Rao y Belavady, 1978).

Los componentes fenólicos, asociados a la cubierta del garbanzo, tienen una influencia negativa en la digestibilidad proteica. Las semillas de garbanzo contienen considerables cantidades

de polifenoles que inhiben la actividad de los enzimas digestivos (Singh, 1984).

Muchas legumbres también contienen hemaglutininas, también llamadas lectinas. Estas proteínas interactúan con las glucoproteínas de la superficie de la membrana de los glóbulos rojos, causando la aglutinación de los mismos. Su unión con las células epiteliales de la mucosa intestinal perjudican la absorción digestiva. Las lectinas son muy sensibles al calor, sobre todo si es húmedo. (Gatel, 1992).

Aunque muchas plantas son potencialmente tóxicas porque contienen glucósidos que por hidrólisis liberan HCN, las concentraciones de HCN encontradas en las semillas del garbanzo están muy por debajo del nivel de toxicidad (Pak y Barja, 1974) .

En casi todas las semillas, se considera a los fitatos como una forma de almacenamiento primario tanto de fosfato como de inositol. Generalmente, el fitato se encuentra complejado a minerales y proteínas, y es esta facilidad de unión del fitato la que hace de él un factor antinutricional. El fitato disminuye la biodisponibilidad de los minerales (Cheryan, 1980) y su interacción con las proteínas provoca la disminución de la digestibilidad de éstas (Periago *et al.*, 1997).

I.1.4. El garbanzo en la alimentación animal y humana.

I.1.4.1. Alimentación animal.

La proteína de las leguminosas es la proteína natural idónea para complementar la existente en los cereales. Cuando ambas se consumen conjuntamente en una proporción adecuada, la calidad de la proteína resultante supera a la de los componentes aislados.

El papel de las leguminosas en la dieta humana de los países poco desarrollados es de capital importancia dado su escaso acceso a las proteínas de origen animal. Esta es la causa por la que el garbanzo rara vez haya sido utilizado como alimento para el ganado, y sean escasos y recientes los estudios iniciados en este sentido (De Miguel, 1991). Así, en un informe técnico realizado por Pérez-Lanzac (1989), se constata un elevado desconocimiento sobre el uso de las leguminosas en la fabricación de piensos para animales. La escasez de suministros o el precio excesivo, son las razones que limitan el empleo de las leguminosas grano entre los que las conocen.

Sin embargo, el hecho de que los costes de producción se reduzcan al possibilitarse la mecanización del cultivo, y que los rendimientos se incrementen, fundamentalmente mediante la adopción de la siembra invernal, puede facilitar la posibilidad de contemplar al garbanzo como una nueva fuente de proteínas para la alimentación animal.

I.1.4.2. Alimentación humana.

Como se ha mencionado anteriormente, el garbanzo se utiliza preferentemente en la alimentación humana preparado de muy diversas formas según los gustos de cada región. En los países occidentales el garbanzo se consume sobre todo cocido, tras un periodo de remojo de las semillas. En cambio, en África y en los países asiáticos, como la India, donde el garbanzo es la base de la alimentación, se consume de muy diversas maneras: tostados, en harina, germinados y fermentados.

Aparte de este consumo más o menos directo del garbanzo, se han llevado a cabo experiencias para tratar de introducir productos derivados del garbanzo, como harinas y concentrados proteicos, en la formulación de ciertos alimentos, principalmente productos de panadería y emulsiones cárnicas. En el caso de las mezclas trigo-garbanzo, lo que se busca principalmente es la complementación de sus aminoácidos. Así los cereales, pobres en lisina y

relativamente ricos en azufrados, mejoran su balance aminoacídico cuando se mezclan con las leguminosas que son ricas en lisina y escasas en azufrados. Dodok *et al.* (1993) han estudiado el efecto de la sustitución de la harina de trigo por harina integral de garbanzo en la elaboración de pan y de galletas. El porcentaje de sustitución fue de un 10 y un 20%. La harina de garbanzo le dio un color amarillento al pan y disminuyó su volumen, con lo que la aceptabilidad del producto final fue menor. En el caso de la fabricación de las galletas, la sustitución del trigo por garbanzo en las mismas proporciones fue más ventajosa que en el caso del pan. Junto a la mejora del valor nutritivo de las proteínas, no se afectaron negativamente ninguna de las características sensoriales examinadas. Los autores terminan recomendando que, en el caso de la elaboración de pan, el grado de sustitución de la harina de trigo por harina de garbanzo no debería ser superior al 10% mientras que el 20% de sustitución es muy adecuado en la preparación de las galletas, sobre todo teniendo en cuenta la mejora de sus propiedades nutritivas.

El principal objetivo que se busca cuando se sustituye parte de las proteínas animales de un alimento por proteínas vegetales es el abaratamiento del producto, aunque también puede ser interesante la modificación de sus propiedades funcionales. La inclusión de un 20% de garbanzos en la elaboración de salchichas (Abo Bakr, 1987) da lugar a un producto que no es deficitario en ningún aminoácido esencial según los parámetros de la FAO, con un CEP de 3.01, superior al de la caseína (2.50), y con una digestibilidad de un 93.5%. Otros autores como Moharran *et al.* (1987) han comparado hamburguesas preparadas con un 25% de harina de garbanzo y hamburguesas control sin sustituir. A pesar de que se verificó, respecto al control, una disminución en todos los aminoácidos esenciales, en el color y en el flavor, la adicción de harina de garbanzo mejoró la textura. La aceptabilidad total del producto, juzgada por panelistas entrenados, fue de un 77.0% frente a un 82.1% del control.

También se han investigado las posibilidades de las semillas de garbanzo en la alimentación infantil, como en un trabajo de Ulloa *et al.* (1988), en el que se estudia la preparación y la calidad nutricional de una fórmula infantil, hecha a base de concentrado proteico de garbanzos como

única fuente de proteínas. Este concentrado, preparado mediante ultrafiltración, y con un contenido proteico de un 67.8%, se añade a la fórmula en una proporción de un 24.3%. Para mejorar el balance de aminoácidos, junto al resto de los demás nutrientes se añadió metionina. El CEPN de la fórmula infantil, respecto a la caseína fue de un 83.6%, con lo que los autores consideran que este producto, preparado a partir de un concentrado proteico de garbanzos, es potencialmente utilizable como sustituto de la leche en niños con problemas gastrointestinales.

Otros intentos, siempre a nivel experimental, de popularizar el uso del garbanzo o sus proteínas como ingredientes de alimentos, han sido la preparación de una bebida con sabor a chocolate a partir de garbanzos germinados (Fernández-De Tonella y Berry, 1987) y la formulación de una mezcla vegetal rica en proteínas a partir de cacahuete, garbanzo y sésamo (Hanafy *et al.*, 1970).

I.2. Aislados proteicos de origen vegetal.

Los aislados proteicos preparados a partir de materias vegetales son ingredientes alimentarios de alta calidad que se usan para mejorar tanto la composición nutricional como las características funcionales de los alimentos. Algunos de estos aislados, obtenidos a partir de las semillas de soja, llevan utilizándose en alimentación desde hace más de 30 años (Waggle *et al.*, 1989).

I.2.1. Preparación.

Las principales materias primas utilizadas para la preparación de aislados proteicos vegetales son las semillas de plantas ricas en proteínas, principalmente leguminosas y subproductos de industrias extractoras de aceite como la colza y el girasol (Tabla 1).

La elaboración de los aislados supone el aislamiento de las proteínas del resto de los componentes no proteicos de la materia prima de que se parte. Estos constituyentes no proteicos se pueden dividir en:

a) Lípidos. Su contenido varía mucho según la materia prima de que se trate. Así en las oleaginosas el porcentaje en lípidos alcanza hasta un 40% mientras que en las leguminosas y en los cereales es muy bajo ($\leq 10\%$). Su presencia es muy negativa ya que tienden a asociarse a las proteínas de los aislados dando lugar a problemas de enranciamiento durante el procesado y almacenamiento de los mismos (Millán *et al.*, 1995).

b) Fibras como la celulosa, hemicelulosas, lignina, sustancias pécticas, etc, generalmente más abundantes en las cubiertas de los granos y de gran importancia, por su abundancia, en

Tabla 1. Composición media y valor proteico de diversas fuentes vegetales.

	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Glúcidos (%)	Humedad (%)	Coefficiente de eficacia proteica ^a	Aminoácido limitante	Factores antinutricionales o tóxicos
Grano de soja	40	20	15	7	2.3	Met	IT ^b , hemaglutinas, α -galactósidos
Grano de algodón	53	30	10	6	2.3	Lys, met	Gosipol
Grano de cacahuete	25	50	20	9	1.7	Met	Aflatoxinas
Grano de girasol	30	40	26	6	2.1	Lys	Polifenoles
Grano de colza	26	33	35	3	2.6	Equilibrado	Glucosinolatos, sinapina
Grano de altramuz	40	10	45	10	0.7	Met	Alcaloides
Grano de guisante	23	2	70	12	2.0	Met	IT, fitatos
Grano de haba	30	2	60	12	1.8	Met	IT, vicina, taninos, convicina
Grano de alfalfa	25	5	45	80	1.6	Met	Alcaloides, taninos cumarinas, etc
Grano de trigo	14	2	78	10	1.8	Lys	
Grano de avena	13	10	72	9	2.2	Lys	
Grano de maíz	10	5	80	10	1.2	Lys, trp	
Grano de arroz	8	1	87	12	1.7	Lys	
Tubérculo de patata	9	0	73	78	2.0	Lys, thr	

Fuente: Cheftel *et al.*, 1989a.

a: Calculado sobre la base de un CEP de 2.5 para la caseína.

b: Inhibidores de la tripsina.

algunas fuentes proteicas tales como la torta de girasol desengrasada (Parrado, 1991).

c) Hidratos de carbono insolubles como la mayor parte del almidón.

d) Compuestos solubles en agua o en mezclas agua-alcohol. Dentro de este grupo se encuentran el almidón soluble, los azúcares solubles, las sustancias minerales y la mayoría de los compuestos antinutricionales como son los polifenoles, glucosinolatos, alcaloides, saponinas, α -galactósidos y los fitatos. Entre los azúcares solubles conviene destacar a los azúcares reductores por su capacidad de reaccionar con ciertos aminoácidos de las proteínas (reacción de Maillard) provocando una disminución de la biodisponibilidad de aminoácidos esenciales, sobre todo de lisina, al reaccionar los grupos carbonilo de los azúcares reductores con el grupo ϵ -NH₂ de este aminoácido (Friedman, 1996b). Los polifenoles, a pH alcalinos, se oxidan a quinonas las cuales a su vez polimerizan a pigmentos oscuros que disminuyen la calidad del aislado. Los grupos carbonilo de las quinonas son además susceptibles de reaccionar con los grupos amino de las proteínas de forma análoga a los azúcares reductores (Cheftel *et al.*, 1989b). Los glucosinolatos, alcaloides, saponinas, α -galactósidos y los fitatos son también compuestos indeseables por los efectos tóxicos que provocan en el hombre y los animales (Gausserès *et al.*, 1996).

Así pues, el proceso de obtención de aislados proteicos supone una serie de etapas encaminadas a eliminar o disminuir los componentes no proteicos para conseguir un producto final con 80-90% de proteínas.

I.2.1.1. Obtención de concentrados proteicos.

La Figura 2 muestra el tratamiento general de las materias primas ricas en proteínas. Naturalmente este esquema puede modificarse en función del producto del que se parta y de los productos finales que se deseen obtener.

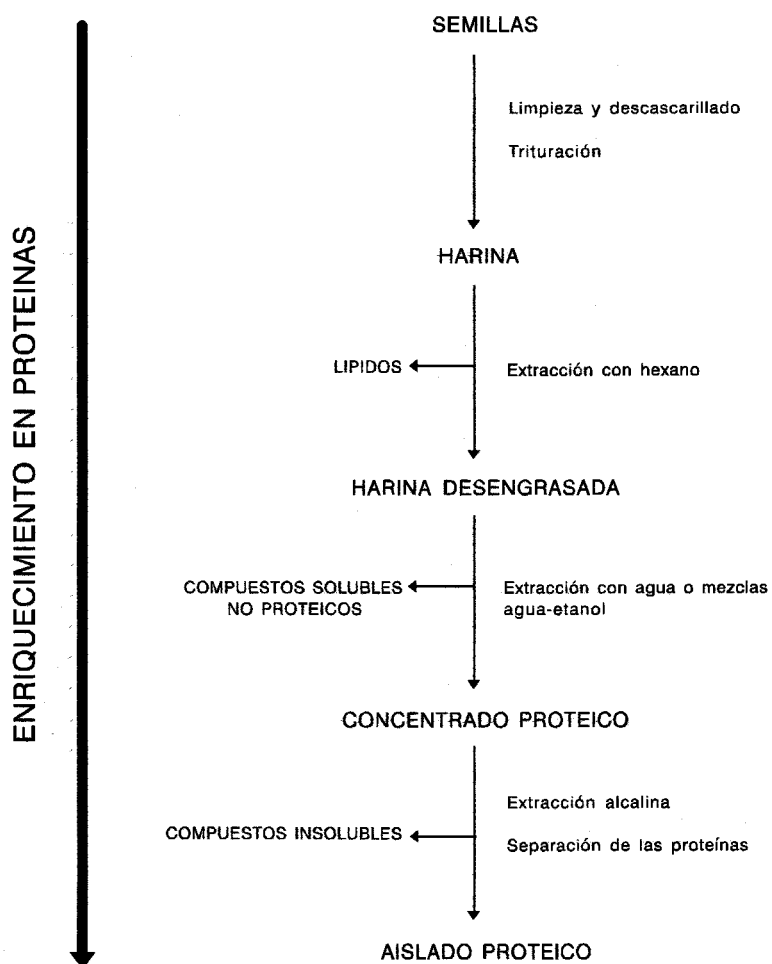


Figura 2. Procesado general de las materias proteicas vegetales.

Primeramente, las semillas son limpiadas y desprovistas de materias extrañas como piedras, arena, polvo, semillas extrañas, granos dañados, germinados o inmaduros, etc. En el descascarillado se realiza la separación de las cubiertas de las semillas, ricas en compuestos

celulósicos. Para ello, las semillas son previamente humedecidas ya que la hidratación facilita la separación.

Industrialmente, el desengrasado se lleva a cabo mediante extracciones con hexano. Una vez descascarilladas y troceadas, las semillas son calentadas a unos 65°C con el fin de aumentar la permeabilidad de las membranas celulares, hacer más fluida la grasa y regularizar la humedad. Seguidamente, las almendras son aplastadas (copos) entre 2 cilindros planos para aumentar la superficie de contacto con el hexano.

Por razones de seguridad y de salud, los restos de hexano que quedan tras el desengrasado tienen que ser eliminados. Esto tiene lugar en el desolventizador. El sistema habitualmente empleado es el denominado flash-desolventización. Con este sistema se evapora el disolvente usando vapor de hexano calentado a 115°C en lugar de con vapor de agua, usado en la desolventización clásica (Fulmer, 1988). De esta forma se consigue una menor desnaturalización de las proteínas ya que éstas al estar poco hidratadas resisten mejor las altas temperaturas. La desolventización final tiene lugar en un desodorizador clásico en el que el producto es calentado y el hexano residual se elimina mediante una corriente de gas inerte. El hexano es un disolvente adecuado para la extracción de los triglicéridos pero otras clases de lípidos, principalmente lípidos polares, no son extraídos de manera eficaz con hexano (Kates, 1986a) y van a desempeñar un papel fundamental tanto en las características como en la conservación de los aislados.

La preparación de concentrados proteicos tiene como objetivo la extracción lo más completa y selectivamente posible de los compuestos solubles no proteicos. Como resultado se obtiene un producto rico en glúcidos insolubles y en proteínas (hasta un 70%). La elección del medio de extracción es fundamental, y está condicionada por aspectos nutritivos, organolépticos y tecnológicos. Debe ser apto para la alimentación y fácilmente eliminado del concentrado, tiene que ser capaz de eliminar la mayor parte de los compuestos no proteicos solubilizando mínimamente las proteínas y por último, debe desnaturalizar a éstas lo menos posible. Dos son

los solventes usados para la obtención de concentrados proteicos: el agua y las mezclas agua-etanol. En el caso del agua es necesario disminuir la solubilidad de las proteínas bien ajustando el pH de la extracción al punto isoeléctrico (pI) de las proteínas o bien insolubilizándolas mediante coagulación térmica.

El uso de agua a pH ajustado al pI, patentado por Sair en 1959, permite la eliminación de la mayor parte de los compuestos antinutricionales, parte de las sales y de los compuestos nitrogenados no proteicos pero también de parte de las proteínas. El método general consiste en sucesivas extracciones y centrifugaciones para separar la materia insoluble de los sobrenadantes, en los que van disueltos los compuestos que se quieren eliminar. La extracción acuosa a pH controlado es poco desnaturizante para las proteínas lo cual permite mantener las propiedades funcionales del producto aunque algunos compuestos responsables de olores y sabores desagradables no son eliminados.

La insolubilización de las proteínas, previo a la extracción con agua, se efectúa tratando la harina con vapor de agua a presión atmosférica (McAnelly, 1964). El vapor además permite el arrastre de componentes volátiles responsables de olores y sabores desagradables como son los ácidos grasos de cadena corta y sus derivados oxidados. Sin embargo, se produce una intensa disminución de las propiedades funcionales de los concentrados, en especial de las propiedades interfaciales acuoso-oleosas y agua-aire, y por supuesto, de la solubilidad. El calor prolongado también puede dar lugar al desarrollo de colores oscuros y sabores amargos como resultado de reacciones de Maillard. Las técnicas de extracción son idénticas a las usadas anteriormente.

Ni el hexano usado en el desengrasado ni el agua son eficaces en la eliminación de ciertos compuestos responsables de malos olores y sabores del producto. Entre estos dos disolventes de polaridades tan dispares están las mezclas hidroalcohólicas, que permiten una adecuada extracción de compuestos tales como lípidos polares y sus derivados oxidados, fenoles y ácidos fenólicos, isoflavonas, esteroides, azúcares, etc. Además las proteínas, en general, son poco solubles en

mezclas agua-alcohol sobre todo si el alcohol representa más del 40% v/v (Kozłowska *et al.*, 1977). La utilización de mezclas hidroalcohólicas conlleva una disminución de la solubilidad de las proteínas del concentrado respecto a la utilización del agua e incluso del alcohol puro (Smith *et al.*, 1951). Esta desnaturalización es máxima en concentraciones intermedias. El etanol es generalmente el alcohol de elección en la preparación de concentrados mediante mezclas hidroalcohólicas. La técnica consiste en extraer a contracorriente la harina o los copos con mezclas de etanol al 50-70% v/v y secar posteriormente el producto (Campbell *et al.*, 1985). El extracto es destilado para recuperar el alcohol que se vuelve a reutilizar disminuyendo así los costes. El contenido de etanol es importante ya que si es bajo la desnaturalización de las proteínas se acrecienta, el alcohol es más difícil de recuperar por destilación y el secado del concentrado se hace más complicado. Por contra, con un contenido superior en alcohol la extracción de los azúcares es insuficiente.

La principal diferencia entre estos 3 métodos de obtención de concentrados proteicos (extracción con agua a pH controlado, extracción con agua tras tratamiento térmico y extracción hidroalcohólica) radica en la marcada insolubilización de las proteínas que se produce en estos dos últimos procesos (Meyer, 1967). Los menores contenidos en oligosacáridos se consiguen con la extracción isoelectrica (Eldridge *et al.*, 1979) mientras que los porcentajes más bajos en lípidos se obtienen extrayendo con mezclas hidroalcohólicas (Clark y Proctor, 1994).

Las mejoras más recientes en la preparación de concentrados proteicos son las que conciernen a la mejora de sus características organolépticas mediante el procedimiento del triple disolvente, que consiste en extraer sucesivamente los copos con hexano, hexano-etanol y etanol-agua (Hayes y Simms, 1973), y sobre todo, al aumento de la solubilidad de las proteínas mediante tratamientos de temperatura y presión (Howard *et al.*, 1980).

I.2.1.2. Obtención de aislados proteicos.

Supone la separación de las proteínas del resto de los constituyentes del concentrado proteico. Esto se realiza mediante la sucesión de dos operaciones (Figura 3).



Figura 3. Elaboración de aislados proteicos a partir de harinas o concentrados proteicos mediante precipitación isoelectrica y ultrafiltración.

En la primera etapa, las proteínas son solubilizadas para separarlas del resto de los compuestos no solubles, principalmente glúcidos insolubles. El extracto obtenido contiene, además de las proteínas, el resto de compuestos solubles del concentrado (compuestos

nitrogenados no proteicos, azúcares, polifenoles, sales, etc). La segunda etapa tiene por objeto la concentración de las proteínas y sobre todo su purificación frente a otros compuestos. Dos son los procedimientos seguidos:

a) La precipitación isoelectrica de las proteínas frente al resto de las moléculas solubles mediante centrifugación. El aislado es así recuperado selectivamente, y se presenta en forma de crema insoluble concentrada. Tras lavarlo, con agua generalmente, y después de una nueva centrifugación, el aislado es secado directamente o previa neutralización.

b) Ultrafiltración, en la que las moléculas solubles no proteicas de bajo peso molecular atraviesan la membrana y constituyen el permeado. El retenido purificado y concentrado se seca directamente.

Los parámetros que rigen la primera etapa, es decir, la solubilización de las proteínas y su separación de los compuestos insolubles, son los referentes a la materia prima (NSI, granulometría) y a las condiciones en que se realiza la extracción (pH y temperatura, relación solvente/materia prima y la duración y el número de extracciones). Aunque muchas de las proteínas vegetales son solubles a pH próximos a la neutralidad, se prefiere extraer las proteínas a pH alcalinos para favorecer la solubilización de las proteínas desnaturalizadas en la preparación de los concentrados. Además algunas proteínas, las glutelinas, requieren pH iguales o superiores a 11 para poder ser extraídas. La sosa es generalmente el álcali utilizado para ajustar el pH aunque es posible emplear otras bases. Las relaciones solvente/materia prima entre 10 y 30/1 apenas da lugar a variación en la cantidad de proteínas extraídas. De todos modos, en algunos casos el uso de relaciones bajas conlleva un aumento de la viscosidad del extracto y por tanto dificulta la correcta centrifugación de la suspensión (Gonçalves *et al.*, 1997). Una clarificación insuficiente del extracto se traduce en una pobre eliminación de los compuestos insolubles, afectando al contenido proteico de los aislados. El efecto de la granulometría de la materia prima es insignificante, mientras que el NSI, lógicamente, es un factor fundamental en la preparación de

los aislados proteicos (Cogan *et al.*, 1967). El tiempo de extracción no suele ser superior a los 60 min ya que si no el rendimiento disminuye probablemente por desnaturalización y coagulación de las proteínas debido a la formación de espumas (Sefa-Dedeh y Stanley, 1979).

En la segunda etapa, las proteínas extraídas del concentrado son precipitadas por adición de ácido clorhídrico hasta que el pH es ajustado al pI de las proteínas. La crema proteica resultante se lava de 1 a 3 veces, principalmente con agua, para extraer los compuestos solubles retenidos por absorción y se recentrifuga. Finalmente, el aislado proteico es neutralizado (opcional) y secado. Las proteínas extraídas también pueden ser recuperadas por ultrafiltración. La principal ventaja de esta alternativa es que permite recuperar no sólo las proteínas insolubles en el pI sino también las solubles. El retenido final se suele dializar para eliminar las pequeñas moléculas solubles y el permeado se puede someter a ósmosis inversa para recircular el agua.

En el caso de las leguminosas ricas en almidón, como son el guisante, el haba y el garbanzo, durante la obtención de los aislados, se produce una asociación entre los lípidos y las proteínas, de manera que el producto final puede contener un 3-8% de lípidos. Para evitar esto, se suele emplear el procedimiento de micelización (Abdel-Aal *et al.*, 1986) que consiste en solubilizar las proteínas mediante una solución salina, generalmente cloruro sódico, para posteriormente, precipitarlas en forma de micelas por dilución con agua. Entre las ventajas de este proceso, figuran una mejor purificación de las proteínas ya que las micelas parece que excluyen a los demás compuestos, y una mejora en las propiedades organolépticas y funcionales ya que la solubilización se realiza a pH neutro en vez de a pH alcalino (más oxidante); y la micelización respeta mejor la estructura nativa de las proteínas que la precipitación isoeléctrica. Entre los inconvenientes que presenta la micelización, respecto a los procedimientos clásicos, están el menor rendimiento en la solubilización de las proteínas por las sales, y unos costes de obtención mayores debidos a los consumos de agua necesarios para diluir el extracto salino.

I.2.2. Usos y aplicaciones de los aislados proteicos.

Actualmente, los aislados proteicos de soja se usan comercialmente en numerosas aplicaciones alimentarias ya que ofrecen ventajas económicas, nutricionales y/o funcionales, manteniendo las cualidades sensoriales deseables necesarias para la aceptación por el consumidor. Estas ventajas, según el tipo de producto, aparecen en la Tabla 2. Existe una gran variedad de aislados de soja disponibles comercialmente, diseñados específicamente para proporcionar las características deseadas según el alimento de que se trate. La mayoría de las aplicaciones tienen lugar en alimentos tradicionales que ya tienen establecidos una serie de parámetros de utilización y calidad. Para tener éxito en estos productos, los aislados deben mantener esta calidad. Esto quiere decir igual o similar color, sabor, aroma, textura y composición química y nutricional. Estos requerimientos, exigidos por el consumidor, determinan el grado de sustitución proteica.

Se usan, junto con proteínas de la carne, en hamburguesas y en productos cárnicos emulsificados tales como las salchichas. En Japón, los aislados de soja se usan junto con proteínas del pescado en productos tradicionales. Productos recientes, tales como “nuggets”, elaborados mediante la combinación de carnes de aves y aislados proteicos, están teniendo una gran aceptación entre los consumidores. Dependiendo de los parámetros económicos y de calidad requeridos, la sustitución de la caseína por aislados puede ser beneficiosa en sucedáneos de quesos, productos de panadería, bebidas y otros productos.

La mejora de la nutrición es la razón primera para el uso de los aislados en carnes magras, fórmulas infantiles, bebidas nutritivas para adultos y suplementos proteicos. En productos de carne magra, proporciona beneficios a personas con un alto nivel de colesterol y triglicéridos en sangre ya que, además de disminuir el contenido en grasas del producto, las proteínas de la leguminosas tienen efecto beneficioso en la reducción de los niveles de colesterol (Sautier *et al.*, 1986). Las fórmulas infantiles basadas en los aislados se elaboran para proporcionar una nutrición completa y las calorías especificadas a los niños alérgicos o que no pueden tomar leche de vaca,

Tabla 2. Principales ventajas en el uso de los aislados proteicos.

VENTAJAS			
Producto	Nutricionales	Funcionales	Económicas
Emulsiones cárnicas	X	X	X
Carne picada	X		X
Músculos cárnicos intactos		X	X
Carne de aves	X	X	X
Tocino ahumado		X	X
Patés de hígado	X	X	X
Mariscos triturados	X	X	X
Músculos de mariscos intactos			X
Sucedáneo de queso		X	X
Crema batida		X	
Postres congelados	X	X	
Sopas y salsas		X	X
Fórmulas infantiles	X	X	X
Bebidas nutritivas para adultos	X		X
Alimentos dietéticos	X	X	X
Suplementos proteicos	X	X	X
Productos de panadería		X	
Leche de soja	X		X

Fuente: Waggle *et al.*, 1989.

así como al resto de los niños. Las principales ventajas en las bebidas nutritivas para adultos, son la flexibilidad de formulación y los efectos hipolipidémicos. En el caso de los suplementos

proteicos, se utilizan para el control dietético así como para fortificar en proteínas el producto. En todo caso, igual que con los alimentos tradicionales, los beneficios nutritivos tienen que ir acompañados con una calidad funcional adecuada para que sean aceptados por el consumidor.

En un gran número de aplicaciones, los aislados proteicos se usan tanto por sus propiedades nutricionales como funcionales. Se emplean para aclarar el color, mejorar la textura de carnes de aves deshuesadas mecánicamente, y para unir piezas intactas de músculos (Kolar *et al*, 1985). También proporcionan textura a las salchichas, mejoran la funcionalidad de patés y dan estabilidad a las emulsiones y espumas. Los aislados aumentan la absorción de agua y mejoran la textura de los productos de panadería.

I.3. Efecto de los lípidos sobre los aislados proteicos.

I.3.1. Lípidos asociados a las proteínas.

Aunque la presencia de lípidos asociados a las proteínas de los aislados se conoce desde hace más de 50 años, la información relativa a este campo es escasa, ya que la mayoría de los trabajos de investigación sobre la interacción lípido-proteína se refiere principalmente a sistemas biológicos tales como membranas celulares y proteínas serológicas. Fueron Smiley y Smith, quienes en 1946, publicaron un trabajo en el que mostraban que se obtenía una especie de sirope marrón cuando se extraían las proteínas de la soja con etanol. La hidrólisis ácida de este material daba lugar a ácidos grasos, colina, azúcares y ácido fosfórico, lo cual era indicativo de la presencia de fosfolípidos.

Las interacciones lípido-proteína dependen de las características eléctricas de los lípidos y las proteínas, y pueden ser electrostáticas, hidrofóbicas e incluso covalentes débiles (Vanderkooi, 1977). Así, mientras que los lípidos neutros interactúan con las proteínas hidrofóbicamente, los lípidos polares lo hacen hidrofóbica e hidrofílicamente. Algunos autores (Fullington, 1969) postulan que la interacción podría ser también indirecta por medio de iones metálicos. Igualmente, la conformación y la distribución de cargas de la proteína desempeñan un papel fundamental en este tipo de asociaciones. En la Figura 4 se muestra de forma esquemática los posibles tipos de uniones entre los lípidos y las proteínas de los aislados.

A pesar de que las proteínas en estado nativo tienen una capacidad muy limitada para unirse a los lípidos, los cambios conformacionales y de carga eléctrica que tienen lugar en las proteínas durante la obtención de los aislados proteicos, incrementan notablemente las interacciones lípido-proteína (Shenouda y Pigott, 1974). De este modo, el desplegamiento de la molécula de proteína provoca la exposición de grupos funcionales ocultos o de dominios de

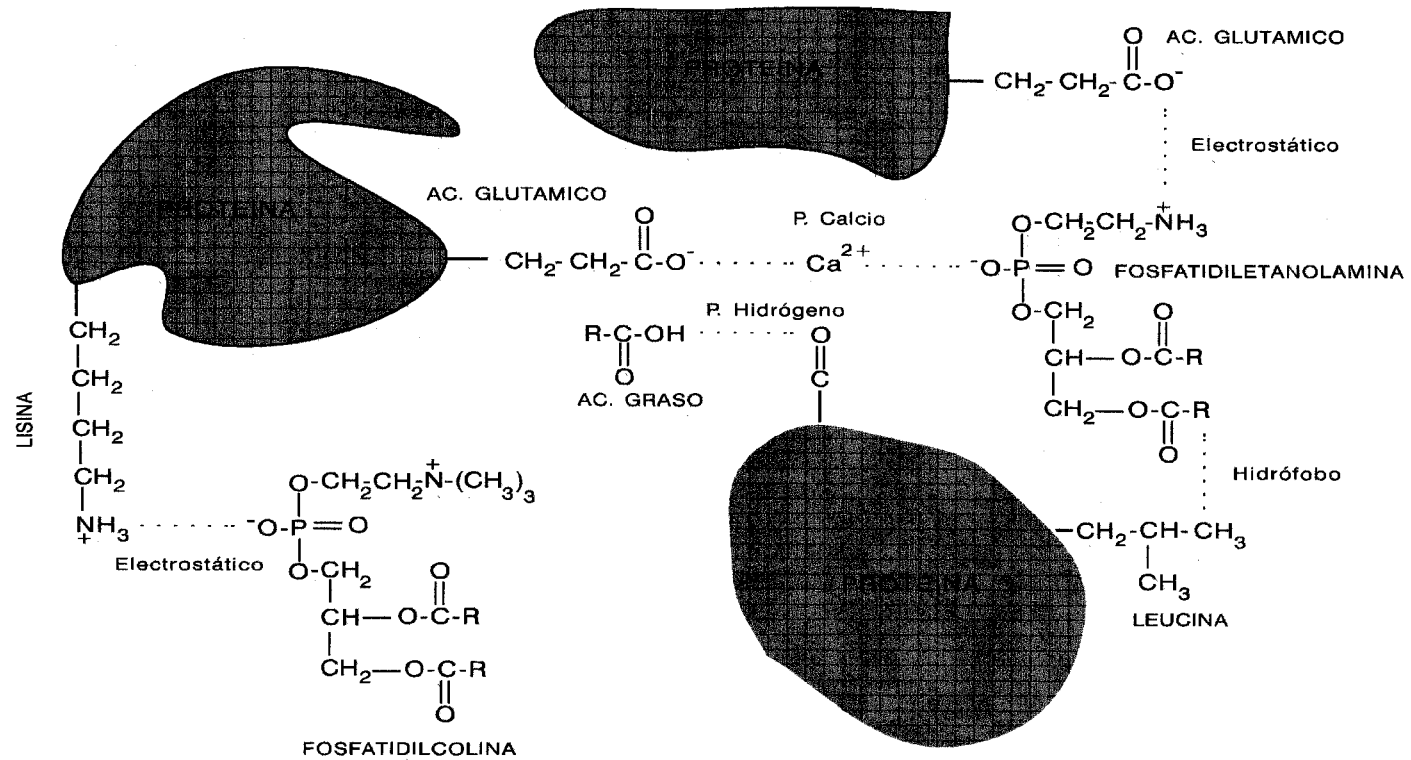


Figura 4. Posibles tipos de unión entre los lípidos y las proteínas de los aislados.

carácter hidrófobo, que pueden entonces reaccionar con los lípidos. El incremento de cargas eléctricas de la proteína en su punto isoeléctrico (Figura 5) conduce a una disminución en las interacciones de tipo hidrófobo, como son las que tienen lugar con los lípidos neutros y con la parte no polar de los lípidos polares, mientras que se incrementan las uniones electrostáticas con éstos últimos. En cualquier caso, parece ser que los lípidos polares tienen una mayor capacidad de fijación a las proteínas que los neutros.

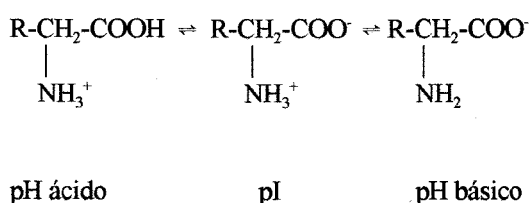


Figura 5. Distribución de cargas eléctricas en las proteínas según el pH.

La eficacia en la extracción de los lípidos asociados a los aislados proteicos depende de la fuerza de la interacción lípido-proteína y de la capacidad del disolvente para romperlas. Los lípidos neutros se unen débilmente a las proteínas y son extraídos fácilmente por numerosos disolventes. En cambio, los fosfolípidos se unen fuertemente a las proteínas y estas uniones sólo se rompen con disolventes muy polares (Arêas *et al.*, 1993). La cantidad de lípidos totales y de fosfolípidos extraídos de un aislado proteico por un disolvente determinado ha sido estudiado por Alcocer y Arêas (1990) quienes usando disolventes de polaridad creciente (desde tetracloruro de carbono hasta metanol) observaron que existía una relación entre los lípidos extraídos y la constante dieléctrica (ϵ) del disolvente empleado. Esta relación sigue una curva hiperbólica y viene dada por la fórmula $C = C_0 - A / \sqrt{\epsilon}$; donde C es la cantidad de lípido extraído por un determinado disolvente; C_0 es la cantidad de lípido presente inicialmente en la muestra; ϵ es la

constante dieléctrica del disolvente y A es una constante directamente relacionada a la intensidad de la interacción entre el lípido y las proteínas. Por tanto, las extracciones más efectivas de los lípidos asociados a proteínas se consiguen con los disolventes más polares como son el etanol y el metanol.

La proporción en la que los lípidos se encuentran en los aislados es baja pero los efectos que producen en las propiedades funcionales y químicas de las proteínas, así como en las características organolépticas del producto, son muy destacados. La composición de estos lípidos es muy heterogénea y abarca desde los más apolares, como son los hidrocarburos, hasta los fosfolípidos (Millán *et al.*, 1995).

La importancia de las interacciones lípido-proteína sobre la funcionalidad de las proteínas de los alimentos ha sido revisada en diversos trabajos. Estas alteraciones funcionales van a repercutir en el procesado de los alimentos, y varias características de los mismos tales como color, olor, estabilidad y textura se ven claramente modificados por estas uniones. Arêas (1986) comprobó que los lípidos residuales presentes en aislados proteicos de pulmón mejoran la extrusión de las proteínas. Esto podría deberse a que los lípidos, como resultado de sus interacciones hidrofóbicas, incrementan las zonas polares de las proteínas, mejorándose así la capacidad de hidratación y las uniones con otras proteínas durante la extrusión. Estos cambios conformacionales parece que no dependen de ningún lípido en concreto aunque cuanto mayor es el contenido lipídico, más zonas polares de la proteína se expusieron. Otro aspecto funcional de las proteínas claramente afectado por los lípidos asociados es la solubilidad. Boatright y Hettiarachchy (1995) han estudiado la influencia de los lípidos presentes en los aislados proteicos de soja, preparados, por un lado, a partir de harina de soja desengrasada con hexano (control), y por otro lado, a partir de una harina desengrasada con hexano y posteriormente con glicerol e isopropanol. Este segundo tipo de aislado, preparado a partir de una harina con el contenido lipídico muy reducido, presentó una solubilidad del 84.0% frente a un 34.0% del control. Estos resultados dan una idea del papel tan negativo de los lípidos en la solubilidad de los aislados

proteicos. No obstante los autores también observaron una modificación de los grupos tioles y una oxidación de la proteína, alteraciones a las que se les puede atribuir parte de la insolubilidad de las proteínas. La influencia de los lípidos en las propiedades emulsionantes de las proteínas ha sido recientemente estudiada (Karleskind *et al.*, 1996), llegándose a la conclusión de que éstas están relacionadas con diversas propiedades fisicoquímicas, y que la solubilidad de las proteínas y la composición en ácidos grasos de los lípidos, son los principales factores que afectaron a la estabilidad de los modelos de emulsión.

Aparte de los efectos que los lípidos por si mismos causan sobre las propiedades funcionales de las proteínas, es bien sabido la facilidad con que se oxidan, sobre todo si sus ácidos grasos son poliinsaturados como ocurre con muchas plantas, y entre ellas, el garbanzo (Sosulski y Gadan, 1988). La oxidación de los ácidos grasos conduce a la formación de una gran variedad de compuestos que van a afectar negativamente al olor y sabor (rancidez), motivo por el cual, el aislado va a ser rechazado por el consumidor (Lamghari *et al.*, 1997). Además, muchos de estos compuestos van a reaccionar covalentemente con los aminoácidos de las proteínas afectando a su valor nutritivo.

I.3.2. Oxidación lipídica.

La oxidación de los ácidos grasos insaturados puede tener lugar por medio de la enzima lipoxigenasa o a través de autooxidación mediante radicales libres. La lipoxigenasa, también conocida como lipoxidasa, cataliza la oxigenación estereoespecífica de los ácidos grasos poliinsaturados, sus ésteres y glicéridos, que contienen el sistema doble enlace *cis,cis*-1,4-pentadieno, para originar un hidroperóxido. Estos hidroperóxidos, formados mayoritariamente a partir del ácido linoleico y linolénico, son transformados por la acción de otros enzimas en numerosos compuestos que van dar lugar a sabores y olores (Zamora *et al.*, 1991).

Los alimentos grasos y los lípidos en general, se alteran fundamentalmente por la acción del oxígeno sobre los ácidos grasos insaturados. Esta oxidación de las grasas se conoce como autooxidación, debido al hecho de que el grado de la misma aumenta a medida que progresa la reacción. A menos que intervengan otros sistemas oxidantes o enzimas, la oxidación tiene lugar mediante un mecanismo de reacción de la cadena radical libre que comprende 3 fases: (1) iniciación o de formación de radicales libres; (2) propagación o de reacción de los radicales libres entre sí y (3) terminación o de constitución de productos no radicales. Los principales productos iniciales de la reacción entre el oxígeno y los ácidos grasos son los hidroperóxidos (Hamilton *et al.*, 1997). A partir de estos hidroperóxidos, y mediante reacciones de una enorme complejidad, se generan numerosos tipos de compuestos tales como hidrocarburos, aldehídos saturados, monoinsaturados, diinsaturados, hidroxialdehídos, aldehidohidroperóxidos, cetoaldehídos, dialdehídos, cetonas, alcoholes, alcoholes insaturados, ácidos, ácidos insaturados, ésteres, hidroxieésteres, oxoésteres, oxohidroxieésteres y hasta compuestos heterocíclicos (Grosch, 1987).

La elaboración de los aislados proteicos tiene lugar mediante numerosos pasos en los que se favorece la oxidación de los lípidos: trituración de las semillas, calentamientos, contacto con medios acuosos alcalinos y ácidos. A esto hay que añadir el almacenamiento y los posteriores tratamientos que pudiera sufrir en la incorporación a los alimentos.

Los lípidos asociados a los aislados proteicos se oxidan ya durante la preparación de éstos como lo demuestra la disminución, respecto a la harina de partida, de los ácidos grasos insaturados presentes en algunos fosfolípidos (Millán *et al.*, 1984). Esta oxidación está de acuerdo con el incremento en los aislados de algunos derivados oxidados (Millán *et al.*, 1983). Liukkonen *et al.* (1992) estudiando el procesado de los granos de avena comprobaron el efecto del agua en los lípidos. Comparando antes y después del remojo, observaron una disminución del contenido de triglicéridos acompañada del aumento de los ácidos grasos libres, mientras que el contenido en fosfolípidos se mantuvo constante. Los autores sugieren que estos cambios se deben a hidrólisis de los triglicéridos y que no ocurre oxidación ya que no hay pérdida selectiva de ácidos

grasos insaturados. Esta hidrólisis es probablemente debida a la acción de la lipasa que se libera durante la rotura de la semilla (Welch, 1977).

El procesamiento de los concentrados proteicos tiene una gran influencia en su posterior almacenamiento. El calentamiento provoca una drástica oxidación de los lípidos durante el almacenamiento de los concentrados aunque el uso de antioxidante se mostró eficaz en la prevención del deterioro (Lamghari *et al.*, 1997).

Los métodos habituales utilizados por la industria para prevenir el deterioro de los lípidos suelen ser el acortamiento de los tiempos de procesamiento y los tratamientos con vapor para inhibir los enzimas, así como la utilización de productos desengrasados (Chen, 1988). Una vez iniciado, el proceso de alteración de los lípidos es difícil de eliminar y la acumulación de productos no deseados es inevitable (Liukkonen *et al.*, 1992).

I.3.3. Interacción de proteínas con productos de oxidación lipídica.

Las proteínas son los componentes mayoritarios más reactivos en los alimentos. Su interacción con los productos procedentes de la oxidación lipídica es compleja ya que intervienen en ella tanto uniones no covalentes como covalentes, y están implicados tanto los hidroperóxidos y radicales como los productos secundarios de oxidación.

I.3.3.1. Interacciones no covalentes.

Este tipo de uniones son análogas a las que tiene lugar entre las proteínas y los lípidos no oxidados, e intervienen en ellas atracciones hidrófobas y puentes de hidrógeno (Gardner, 1979), así como electrostáticas (Beyeler y Solms, 1974). Al parecer, estas interacciones no covalentes son una primera etapa que se produce antes de la unión covalente entre los productos de

oxidación lipídica y las proteínas (Pokorny *et al.*, 1988). Las moléculas no polares tienden a agruparse en las regiones hidrofóbicas accesibles de la proteína, con lo que esta asociación es dependiente de la disponibilidad de las zonas hidrofóbicas de las proteínas, lo cual a su vez depende de la conformación de las mismas. Aunque las propiedades funcionales de las proteínas se ven afectadas por este tipo de uniones, no hay evidencia de que afecten a sus propiedades nutricionales.

I.3.3.2. Interacciones covalentes.

La modificación covalente se puede dar por mediación de radicales libres lipídicos, o por reacción con los productos secundarios de oxidación.

A) Reacciones radicalarias.

Los ataques radicalarios pueden tener lugar sobre los carbonos α de las proteínas o sobre las cadenas laterales de los distintos aminoácidos. En el primer caso se produciría la abstracción de un protón de un carbono α para dar lugar a un radical proteínico (Gardner, 1983) que podría combinarse con otro radical análogo produciéndose una polimerización proteica que implicaría cambios en las propiedades funcionales de las proteínas y, posiblemente, una menor digestibilidad proteica al dificultarse el acceso de los enzimas digestivos a los enlaces peptídicos. Estos radicales proteínicos también podrían adicionarse a dobles enlaces o reaccionar con el oxígeno para dar lugar a un hidroperóxido proteico hipotético que ha sido descrito por Gardner (1983). La homólisis de este hidroperóxido llevaría un radical alcoxi que podría escindir-se de forma análoga a como lo hacen los alcoxi lipídicos. Esto permitiría explicar ciertos fenómenos observados como son el incremento de grupos amino libres en proteínas peroxidadas en sistemas carentes de agua, así como escisiones proteicas (Zirlin y Karel, 1969).

Los aminoácidos más sensibles a los ataques radicalarios son cisteína / cistina, metionina,

triptófano, histidina, lisina y tirosina.

La degradación de cisteína probablemente ocurre a través de un tioradical por una abstracción del hidrógeno del grupo tiol (Hidalgo *et al.*, 1992). Como productos de la reacción de la cisteína con lípidos oxidados se han encontrado monóxido y dióxido de cistina, ácido alaninsulfínico y ácido cisteico. Al parecer el dióxido de cistina es sólo parcialmente asimilable mientras que los ácidos alaninsulfínico y cisteico no son asimilables (Finley, 1985). Por otro lado, el estudio de una mezcla de β -lactoglobulina y 13-hidroperóxido del ácido linoleico ha permitido descubrir la dimerización de la proteína a través de radicales tiólicos (Hidalgo y Kinsella, 1989).

Aunque ciertos agentes oxidantes energéticos son capaces de oxidar la metionina a metionina sulfona, los lípidos peroxidantes sólo oxidan la metionina hasta su sulfóxido (Cuq *et al.*, 1978). Diversos estudios (Gjoen y Njaa, 1977; Cuq *et al.*, 1978; Nielsen *et al.*, 1985a) han demostrado que el sulfóxido de metionina es asimilable en gran medida por las ratas ya que es liberado de la proteína, absorbido y reducido a metionina antes de ser utilizado para la síntesis proteica. No obstante, la acumulación de sulfóxido de metionina libre en ciertos tejidos como músculo y plasma parece indicar que la reducción de sulfóxido de metionina a metionina es una reacción incompleta o relativamente lenta.

El ataque a los residuos de triptófano parece que transcurre a través de la reacción de un grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo (Sundberg, 1980). Hay pocos estudios sobre las pérdidas de triptófano aunque se sugiere que la cantidad de oxígeno disponible afecta en gran medida a la extensión de la degradación de este aminoácido (Nielsen *et al.*, 1985b).

El anillo de imidazol de la histidina se degrada con formación de valina y ácido aspártico (Gardner, 1983).

Aunque las pérdidas de lisina se deben sobre todo a la reacción de este aminoácido con

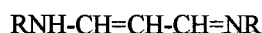
los productos secundarios de la oxidación lipídica, también se han visto reacciones radicalarias con la lisina que podrían tener que ver con cierta dimerización de las proteínas (Karel *et al.*, 1975).

Finalmente, se ha demostrado que la tirosina puede ser oxidada en presencia de una peroxidasa y agua oxigenada (Neukom, 1980). El proceso parece ser que ocurre por abstracción del protón del radical hidroxilo para dar lugar a un radical libre que es estabilizado por resonancia. Sin embargo, la importancia que esta reacción pudiera tener en presencia de lípidos peroxidantes está por determinar.

Todos estos datos vienen a indicar que los aminoácidos que soportan mejor el radical libre son los azufrados, que se oxidan con facilidad, así como los aminoácidos heterocíclicos o aromáticos, quizás por la contribución de los anillos a la estabilización del electrón desapareado.

B) Reacciones no radicalarias.

Son las que tienen lugar entre las proteínas y los productos secundarios de la oxidación lipídica. El término de productos secundarios se refiere a todos los compuestos químicos que se derivan de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos, aunque la mayoría de los estudios se han llevado a cabo con aldehídos por ser éstos muy reactivos con los grupos amino de los aminoácidos. Debido a que los grupos α -amino de las aminoácidos se encuentran formando los enlaces peptídicos, y por tanto son poco reactivos, desde el punto de vista de la alteración de las proteínas el aminoácido más interesante es la lisina, que además es limitante en muchos alimentos. Uno de los aldehídos en los que más se ha estudiado su reactividad con proteínas y aminoácidos es el malondialdehído (MDA) que debido a su bifuncionalidad es capaz de provocar el entrecruzamiento de las proteínas mediante la formación de bases de Schiff conjugadas (Chio y Tappel, 1969):



Base de Schiff conjugada

Esta base de Schiff es además un cromóforo fluorescente con un máximo de excitación a 370 nm y máximo de emisión a 450 nm. La formación de estructuras fluorescentes y la polimerización de las proteínas no es exclusiva del MDA ya que la incubación de polilisina con 13-hidroperóxido o con otros aldehídos mono o bifuncionales conduce a este tipo de modificaciones (Hidalgo y Kinsella, 1989). Estos aldehídos monofuncionales son también capaces de producir la transformación del grupo $\epsilon\text{-NH}_2$ en una sal de piridinio (Suyama y Adachi, 1979). Otra consecuencia de la reacción de los grupos amino con los aldehídos, especialmente con los aldehídos α,β -insaturados, es el oscurecimiento no enzimático producido por sucesivas condensaciones de aldehídos con bases de Schiff (Davidek y Jirousova, 1975).

No sólo los grupos amino se unen covalentemente con los aldehídos sino que el grupo tiol de la cisteína reacciona con aldehídos α,β -insaturados o con 4-hidroxi-2-alquenas para formar una tiazolidina (Esterbauer *et al.*, 1976).

Una reciente investigación (Alaiz y Girón, 1994), en la que se ha estudiado los productos de reacción entre la BSA y el (E)-2-octenal, ha venido a confirmar la adición del nitrógeno imidazólico de la histidina al doble enlace del aldehído.

Todos estos posibles cambios que se pueden dar en las proteínas como consecuencia de su interacción con los productos de la oxidación lipídica van a redundar en:

1.- Cambios en las propiedades funcionales de las proteínas como consecuencia de cambios estructurales y de conformación.

2.- Disminución de la digestibilidad proteica ya que estas interacciones conducen generalmente a la formación de polímeros proteicos de difícil digestión por los enzimas.

3.- Formación de derivados de aminoácidos no asimilables por el organismo.

A pesar del papel tan negativo de los lípidos oxidados sobre las proteínas, hay algunos trabajos en los que se refieren efectos beneficiosos de la interacción lípido oxidado-proteína como el de Pokorny y Davidek (1979) en el que se postula que este tipo de interacciones contribuyen a disminuir los olores característicos de algunos de los productos secundarios de la oxidación lipídica. Otro efecto positivo, apuntado en algunos trabajos, es el papel detoxificante de los aminoácidos al reaccionar con algunos productos de oxidación lipídica, que son de por sí tóxicos, pero que se transforman en productos inocuos mediante este tipo de uniones (Debey *et al.*, 1958; Piché *et al.*, 1988).

II. OBJETIVOS

El uso de aislados proteicos vegetales como ingredientes para mejorar las propiedades nutricionales o funcionales de los alimentos, o bien por motivos económicos, es un hecho relativamente frecuente. No obstante, esta utilización a nivel comercial de aislados proteicos vegetales se encuentra prácticamente limitada a los obtenidos a partir de semillas de soja. Existe por tanto, un gran desequilibrio entre el aprovechamiento de las proteínas de soja y el de otras fuentes vegetales, motivado por la gran producción de soja (es la primera leguminosa del mundo), y por la existencia de un mercado fuertemente establecido. Sin embargo, el cultivo en España de soja apenas está extendido mientras que otras leguminosas, son mucho más populares.

Entre las leguminosas destaca el garbanzo, ya que además de su importancia en la Cuenca Mediterránea, es la base de la alimentación de grandes grupos de población como la India. Como se ha visto en la Introducción, las semillas de garbanzo son una fuente muy importante tanto de almidón como de proteínas, y aunque su principal destino es el consumo humano directo, la utilización de parte de la producción para la obtención de aislados proteicos puede ser muy positiva. De hecho, hay un porcentaje de la producción, que podría llegar hasta un 20%, que está constituido por las semillas que se rompen durante la recolección y el procesado, y que en el mejor de los casos, sólo se usan para la fabricación de piensos para animales. A esto habría que sumarle otro porcentaje de semillas que, o bien por su pequeño tamaño, o bien por su dureza, no son apreciados por el consumidor. Por tanto, estas semillas rotas o de baja aceptabilidad podrían ser una excelente materia prima para la elaboración de aislados proteicos.

Un aspecto que sí requiere especial atención son los lípidos de las semillas ya que, como se ha visto, su influencia puede ser decisiva en la aceptabilidad del aislado así como en la calidad nutritiva del mismo. Este es el principal motivo por el que en la preparación de aislados proteicos se suele partir de material desengrasado con hexano, a pesar de lo cual, los lípidos, sobre todo los polares, no son totalmente extraídos. Son pues estos lípidos residuales los que se van a asociar a los aislados proteicos, provocando los inconvenientes antes mencionados.

Todas estas circunstancias son las que nos han animado a estudiar la preparación de aislados proteicos a partir de semillas de garbanzo, centrándonos en varios puntos:

1.- Obtención de aislados proteicos con el mayor rendimiento y los menores costes posibles, en relación a una posible futura producción a nivel industrial.

2.- Caracterización química de estos aislados así como un análisis de sus propiedades funcionales básicas.

3.- Estudio de las proteínas de los aislados, incluyendo su digestibilidad *in vitro*.

4.- Estudio pormenorizado de los lípidos asociados a las proteínas de los aislados.

5.- Análisis, a través de incubaciones modelo, de los daños de lípidos a las proteínas de los aislados.

III. APARATOS, MATERIALES Y METODOS

III.1. Aparatos.

III.1.1. Cromatografía líquida.

Se utilizó un sistema de cromatografía de proteínas de baja presión de la casa Pharmacia Biotech. (Uppsala, Suecia) constituido por bomba peristáltica P-3, inyector manual de muestras, unidad óptica (280 nm) y control modelo Single Path Monitor UV-1 conectados a un registrador REC-481, y un colector de fracciones FRAC-100. También se usó un equipo de cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC) y un aparato de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El sistema FPLC (Pharmacia Biotech) consta de: controlador LCC 500 PLUS, dos bombas P 500, monitor-detector (280 nm) de luz ultravioleta UV-M y colector de fracciones LKB FRAC-200. El sistema está informatizado mediante el programa FPLC Director (Pharmacia Biotech). El aparato HPLC (Waters, Milford, MA, EUA) está integrado por un controlador modelo 600E, inyector automático Wisp 712 y detector ultravioleta-visible modelo 484. La adquisición de datos y el procesado de los mismos se realizó mediante el programa informático Maxima 820 versión 3.3. La columna se mantuvo a 18°C con un controlador de temperatura Julabo F10.

III.1.2. Cromatografía gaseosa.

El cromatógrafo de gases utilizado es un modelo 5890 Series II equipado con un detector de ionización en llama y acoplado a un integrador 3390 A Integrator, ambos de la casa Hewlett Packard (Palo Alto, CA, EUA). El gas portador usado fue hidrógeno con una presión en cabeza de columna de 12 psi y un flujo de 1 ml/min, empleándose nitrógeno como gas auxiliar.

III.1.3. Equipo de electroforesis.

Las electroforesis se llevaron a cabo en un equipo Mini Protean (Bio Rad, Richmond, CA, EUA) conectado a una fuente eléctrica modelo ECPS 3000/150 de la casa Pharmacia Biotech.

III.1.4. Determinación del contenido en nitrógeno.

Las mediciones de nitrógeno se realizaron en un aparato Kjeltex Auto 1030 Analyzer, llevándose a cabo la digestión de las muestras en un digestor modelo Digestion System 12 (Tecator, Suecia).

III.1.5. Espectrofotómetro.

Modelo DU 640 Spectrophotometer (Beckman Instruments, Fullerton, CA, EUA) equipado con lámparas de tungsteno (visible) y de deuterio (UV).

III.1.6. Centrífuga.

Modelo RC5C de Sorvall Instruments (Wilmington, DE, EUA) provista de rotores SS-34 y GSA.

III.1.7. Otros aparatos.

Equipo para la determinación de fibra Fibertec System E 1023 Filtration Module (Tecator, Suecia), liofilizador modelo Freeze Mobile 3 (Virtis), rotavapor Eyela (Tokio Rikakikai Co. Ltd., Tokio, Japón), estufa y sonicador modelo Ultrasons de la casa Selecta (Barcelona, España), balanza de precisión (± 0.1 mg) AJ100 (Mettler, Alemania).

III.2. Materiales.

III.2.1. Material vegetal.

Semillas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) var. *athenas*, sembrados en los campos experimentales que la firma Koipesol Semillas, S.A. posee en Carmona (Sevilla).

III.2.2. Kit de calibración para filtración en gel.

Para la calibración de la columna de filtración en gel Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia Biotech.) se emplearon las siguientes proteínas y moléculas de la casa Pharmacia Biotech.: Azul de dextrano (2,000 KDa), tiroglobulina (669 KDa), β -amilasa (200 KDa), albúmina de suero bovino (67 KDa) y ribonucleasa (13.7 KDa).

III.2.3. Kit de calibración para electroforesis.

Se usó un kit de proteínas de bajo peso molecular de la casa Pharmacia Biotech. compuesto por fosforilasa b (94 KDa), albúmina de suero bovino (67 KDa), ovoalbúmina (43 KDa), anhidrasa carbónica (30 KDa), inhibidor de tripsina de la soja (20.1 KDa) y α -lactalbúmina (14.4 KDa).

III.2.4. Aminoácidos.

La cuantificación de los aminoácidos se llevó a cabo mediante una solución patrón de la casa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) que contiene 17 aminoácidos en una concentración de 2.5 μ moles/ml (1.25 μ moles/ml en el caso de la L-cistina). La relación completa de estos aminoácidos es: L-alanina, L-arginina, L-ácido aspártico, L-cistina, L-ácido glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-tirosina

y L-valina.

III.2.5. Concentradores de proteínas.

Membranas de 10 Kda de la casa Millipore (Bedford, MA, EUA).

III.2.6. Columnas PD-10 Sephadex G-25M.

De la casa Pharmacia Biotech. con un rango de separación de 1-5 KDa.

III.2.7. Enzimas usados en la digestibilidad proteica *in vitro*.

Tripsina (EC 3.4.21.4) de páncreas porcino tipo IX 15.2 U/ mg proteína, α -quimotripsina (EC 3.4.21.1) de páncreas bovino tipo II 54U/ mg proteína y peptidasa de mucosa intestinal porcina 102 U/ g proteína de la casa Sigma Chemical Co.

III.2.8. Enzimas usados en la determinación del contenido de fibra total.

Solución al 25% en propilenglicol de α -amilasa termoestable, solución en glucosa 1M de amiloglucosidasa y proteasa de la casa Sigma Chemical Co.

III.2.9. Cromatografía en capa fina.

Se emplearon placas de 5x20, 10x20 y 20x20 cm de silicagel 60G (Merck, Darmstadt, Alemania) de 0.25 y 0.50 mm de espesor preparadas en el laboratorio mediante un extendedor de placas. También se utilizaron placas comerciales de silicagel 60A (Whatman International Ltd, Maidstone, Inglaterra) de 20x20 cm y 0.25 mm de espesor así como placas de aluminio de 5x10 cm de silicagel 60 de 0.20 mm de espesor de la casa Merck.

III.2.10. Patrones usados en cromatografía en capa fina.

Laurato de araquidilo, trioleína, ácido oleico, el alcohol oleico, β -sitosterol, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina de la casa Sigma Cematic Co; 1,2 y 1,3-diglicéridos y los monoglicéridos procedentes de la lipólisis del aceite de oliva; esteroles glucósidos, esteroles glucósidos esterificados y los hidrocarburos C_{18} - C_{38} de la casa Supelco (Bellefonte, PA, EUA) y los digalactosildiglicéridos se obtuvieron de las hojas de espinaca.

III.2.11. Patrones usados en cromatografía gaseosa.

Ácidos grasos y esteroides se obtuvieron a partir del aceite de soja. Los alcoholes $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$ y $C_{21:0}$, los azúcares y el inositol se compraron a la casa Sigma Chemical Co. El resto de alcoholes grasos se obtuvieron a partir del aceite de oliva.

III.2.12. Otros productos.

El ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS), el tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), el ácido 2-(N-morfolin)-etanosulfónico (MES), la glicina, el monoclóhidrato de L-lisina, la L-metionina, la albúmina de suero bovino (BSA), el Azul de Bromofenol, el clóhidrato de hidroxilamina, el 1,4-dimercapto-2,3-butanodiol (DTT) y la sal disódica del ácido etilendiaminotetracético (AEDT) fueron de la casa Sigma Chemical Co. El dodecilhidrogenosulfato sódico (SDS) y la ninhidrina fueron de la casa Merck. El TRITON X-100 y la Amberlita IR-120(H⁺) se compraron a la casa Rohm & Haas Co. (Philadelphia, Pennsylvania, EUA) y la 2,7-diclorofluoresceína fue de Aldrich (Milwaukee, EUA). La N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) se compró a Bio Rad mientras que la acrilamida y la N,N'-metilenbisacrilamida fueron de Serva (Heidelberg, Alemania). El resto de reactivos usados fueron de grado analítico.

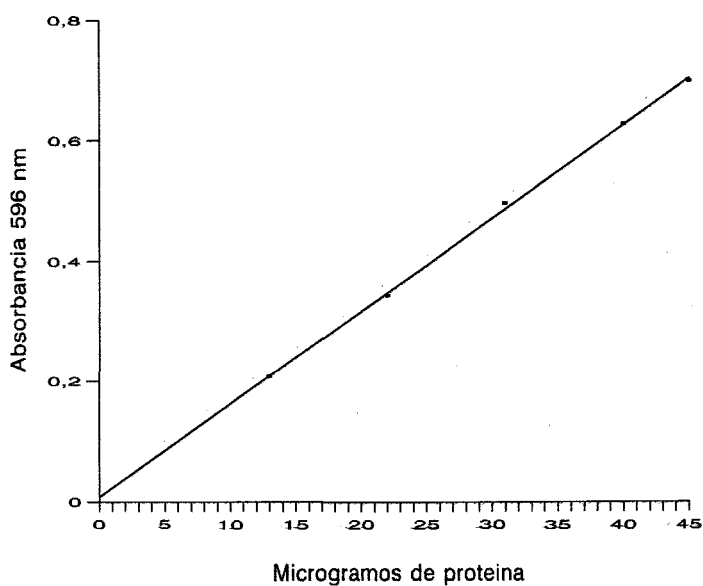
III.3. Métodos.

III.3.1. Determinación cuantitativa de proteínas.

Para cuantificar proteínas se han usado tres procedimientos colorimétricos: el método de Bradford (1976), basado en la reacción de las proteínas con el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva), el método de Lowry *et al.* (1951), en el que ciertos restos aminoacídicos reaccionan con el reactivo del fenol de Folin- Ciocalteu (Merck), y el método basado en la reacción de Biuret entre los enlaces peptídicos de las proteínas y el ión Cu^{2+} (Gornall *et al.*, 1949). La elección de uno u otro método se hizo en base a la concentración en proteínas de las muestras.

El reactivo de Bradford se preparó disolviendo 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 50 ml de etanol 96%, se le añadió 100 ml de H_3PO_4 85% y se llevó a 1000 ml con agua. El volumen de muestra a determinar fue de 100 μl y el de reactivo 3 ml. Tras dejar reaccionar la muestra 15 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 596 nm. La determinación cuantitativa de las proteínas se hizo a partir de una recta de calibración realizada a partir de una solución de 0.45 mg de BSA por ml (Figura 6).

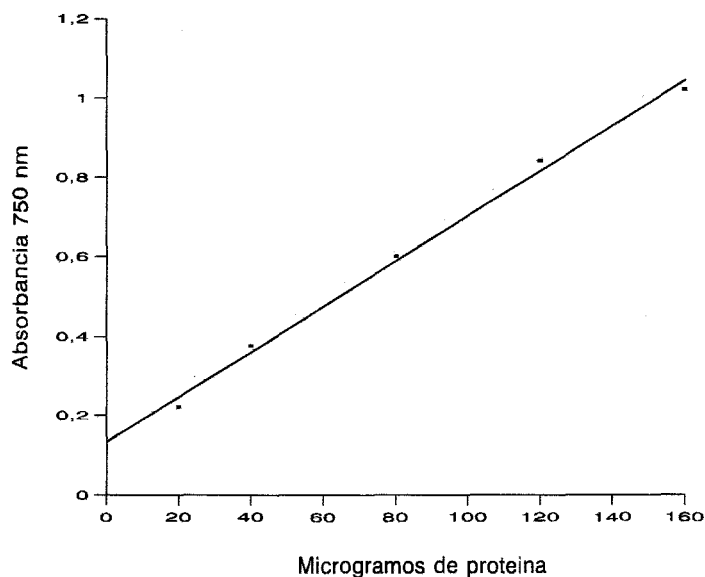
El método de Lowry *et al.* utiliza los siguientes reactivos: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 0.5%, tartrato de sodio y potasio al 1% y el reactivo del fenol de Folin-Ciocalteu 1N . El carbonato sódico, el sulfato de cobre y el tartrato se mezclan en la relación de volúmenes 50:1:1. Las muestras (0.4 ml), una vez añadido 2 ml de la mezcla anterior, se dejaron a temperatura ambiente 20 min. Posteriormente se les añadió 0.2 ml del reactivo del fenol, se mezcló bien y se dejaron a temperatura ambiente 1hr. Se midió la absorbancia a 750 nm, realizandose la determinación cuantitativa mediante una recta de calibración preparada a partir de una solución de 2 mg de BSA por ml (Figura 7).



$$A = -0.0035 + 0.0156 \times \mu\text{g proteína}$$
$$r = 0.9997$$

Figura 6. Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de proteínas según el método de Bradford (1976).

El reactivo de Biuret se preparó disolviendo 1.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y 60 g de tartrato de sodio y potasio monohidrato en 500 ml de agua. Se añadió agitando 300 ml de NaOH al 10%, llevándose con agua a un volumen final de 1000 ml. El reactivo (2.5 ml) se añadió a la muestra (0.5 ml), se agitó y tras 30 min, se midió la absorbancia a 570 nm. La determinación cuantitativa se hizo utilizando una recta de calibración realizada a partir de una solución de 10 mg de BSA por ml (Figura 8).



$$A = 0.1331 + 0.0057 \times \mu\text{g proteína}$$

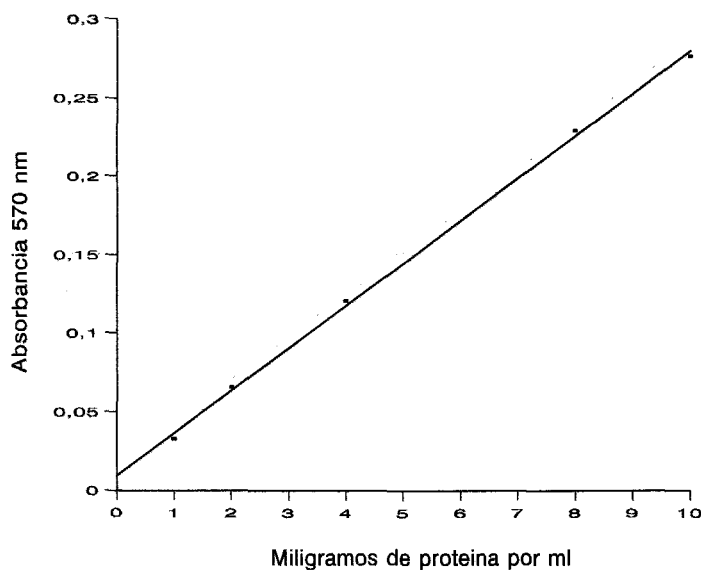
$$r = 0.9976$$

Figura 7. Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de proteínas según el método de Lowry *et al.* (1951).

III.3.2. Determinación del contenido de nitrógeno.

Se hizo de acuerdo al procedimiento Kjeldahl que se basa en la transformación del nitrógeno de las muestras en sulfato amónico durante la digestión que tiene lugar con el ácido sulfúrico. Una vez digerida las muestras, se les añade NaOH (al 35-40%) para convertir el amonio en amoniaco, que es arrastrado mediante vapor de agua a una solución de ácido bórico que contiene indicadores ácido-base. El amoniaco se valora indirectamente a partir del HCl que se añade, para mantener el punto de

equivalencia, a la solución de ácido bórico. Finalmente, el contenido en nitrógeno puede calcularse a partir del amoniaco valorado. La conversión de nitrógeno en proteína se ha calculado multiplicando el contenido en nitrógeno por 6.25.



$$A = 0.0097 + 0.0270 \times \text{mg proteína} / \text{ml}$$
$$r = 0.9995$$

Figura 8. Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de proteínas según la reacción de Biuret.

III.3.3. Humedad y cenizas.

La humedad se calculó por diferencia de peso entre la muestra inicial y la muestra seca a 110°C. El contenido de cenizas se determinó también por gravimetría, incinerando las muestras a 550°C durante 36 h.

III.3.4. Fibra total.

El porcentaje en fibra total de las muestras se midió según el ensayo de Lee *et al.* (1992) que se basa en la digestión de las muestras por las enzimas α -amilasa termoestable, proteasa y amiloglucosidasa, y posterior determinación del residuo resultante por gravimetría. Las muestras desengrasadas (1 g) se agitaron en 40 ml de tampón MES 0.05 M, TRIS 0.05 M pH 8.2. Se añadió 50 μ l de la solución de α -amilasa termoestable e incubó con agitación 15 min a 95-100°C. Se enfrió a 60°C y añadió 100 μ l de una solución de 50 mg de proteasa por ml del tampón MES/TRIS, manteniéndola en agitación continua a 60°C durante 30 min. Se añadió 5 ml de HCl 0.56 N y ajustó el pH a 4.0-4.7. Se añadió 300 μ l de la solución de amiloglucosidasa e incubó con agitación constante a 60°C durante 30 min. Una vez finalizada la digestión, a las muestras se les añadió 225 ml de etanol 96% a 60°C, dejándose precipitar la muestra 1hr a temperatura ambiente. Se filtraron las muestras a través de filtros con un tamaño de poro de 40-60 μ m cubiertos con tierra de diatomeas tipo Celita 545 AW (Sigma Chemical Co.), lavando el retenido con etanol 78%, etanol 96% y acetona. Al residuo, una vez secado en estufa a 105°C y pesado, se le determinó el contenido en cenizas y proteínas. El porcentaje en fibra total se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Fibra (\%)} = \frac{\text{Residuo (g)} - \text{Proteínas (g)} - \text{Cenizas (g)}}{\text{Muestra (g)}} \times 100$$

III.3.5. Sólidos disueltos, azúcares solubles y polifenoles.

Estos tres ensayos se hicieron a partir de un mismo extracto etanólico que se preparó extrayendo las muestras (2-10 g) con etanol 95% en un soxhlet durante 16 hr. El extracto se filtró por papel Whatman n° 1, y una vez concentrado en el rotavapor, se llevó a un volumen fijo (100 ó 200 ml). El contenido en sólidos disueltos se determinó según Pomenta y Burns (1971): alícuotas de

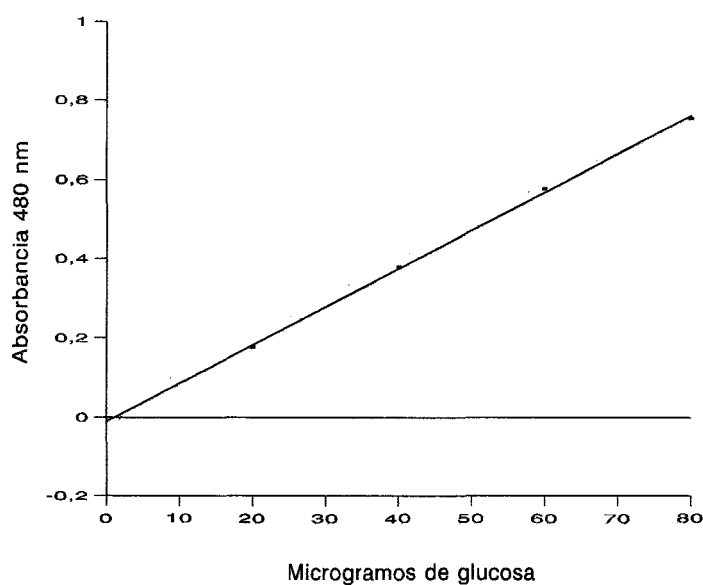
10-20 ml del extracto etanólico se llevaron a sequedad en estufa a 90°C, pesándose el residuo que se refirió a la muestra extraída como tanto por ciento p/p en sólidos disueltos.

Los azúcares solubles se determinaron según Dubois *et al.* (1956). Este método se basa en la reacción coloreada que tiene lugar entre los azúcares, el fenol y el ácido sulfúrico. Alícuotas del extracto etanólico se llevaron a 1 ml con agua, añadiéndoles 1 ml de fenol al 5% en agua y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se agitaron y dejaron enfriar a temperatura ambiente, midiéndose la absorbancia a 480 nm frente a un blanco. La determinación cuantitativa se hizo mediante una recta de calibración preparada a partir de una solución de 10.3 mg de glucosa por ml (Figura 9). Los contenidos en azúcares solubles se refirieron a las muestras extraídas en tanto por ciento p/p.

El contenido en polifenoles de las muestras se determinó según el procedimiento de Moores *et al.* (1948) que cuantifica los polifenoles a partir de su absorbancia a 324 nm. La recta de calibración se hizo usando una solución patrón de ácido clorogénico con una concentración de 0.74 mg/ml (Figura 10). Los contenidos en polifenoles se refirieron a las muestras extraídas en tanto por ciento p/p.

III.3.6. Solubilidad proteica.

Según el método de Morr *et al.* (1985). Las muestras (250 mg) se homogeneizaron en 20 ml de una solución de NaCl 0.1 M y se mantuvieron en agitación durante 1hr a pH 7.0. Los extractos se centrifugaron a 20000 x g durante 30 min recuperándose los sobrenadantes a los que, una vez filtrados por papel Whatman nº 1, se les midieron los contenidos en nitrógeno. Los resultados se refirieron como porcentaje en peso de proteína inicial solubilizada.



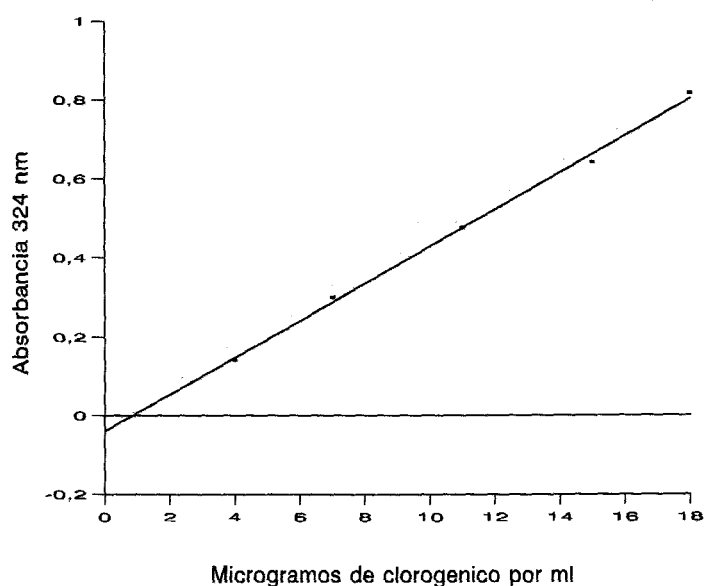
$$A = -0.0098 + 0.0094 \times \mu\text{g glucosa}$$

$$r = 0.9995$$

Figura 9. Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de azúcares solubles.

III.3.7. Absorción de agua y grasa. Capacidad emulsionante.

La medida de absorción de agua se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Sosulski (1962). La muestra (3 g) se mezcló usando una varilla de vidrio con 25 ml de agua destilada. Tras centrifugar a 1000 x g durante 25 min, se eliminó el sobrenadante y el sólido, se secó 25 min a 50°C en una estufa y pesó. Se calcularon los gramos de agua absorbidos por cada 100 g de muestra.



$$A = -0.0308 + 0.0456 \times \mu\text{g clorogénico} / \text{ml}$$

$$r = 0.9998$$

Figura 10. Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de polifenoles.

La determinación de la absorción de grasa y de la capacidad emulsionante se realizaron de acuerdo a los protocolos de Lin *et al.* (1974). Para la medida de la absorción de grasa, a 0.5 g de muestra se le añadió 6 ml de aceite de soja, y tras agitar la mezcla con una varilla, se dejó reposar durante 30 min. Después de centrifugar a 1600 x g durante 25 min, se leyó el volumen de aceite separado, expresándose los resultados como gramos de aceite absorbidos por cada 100 g de muestra.

Para la determinación de la capacidad emulsionante se pesaron muestras de 2.5 g que se mezclaron y agitaron durante 15 min con 45 ml de agua destilada. Una vez añadidos 1.5 g de NaCl, se continuó agitando 1 min más, para posteriormente, añadir desde una bureta 25 g de aceite de soja.

Después de agitar durante 1 hr más, la mezcla se calentó a 85°C durante 15 min, agitando suavemente. Transcurrido este tiempo se enfrió bajo chorro de agua y se centrifugó a 1460 x g, leyéndose el volumen de aceite separado. Los resultados se expresaron como gramos de aceite emulsionado por cada 100 g de muestra.

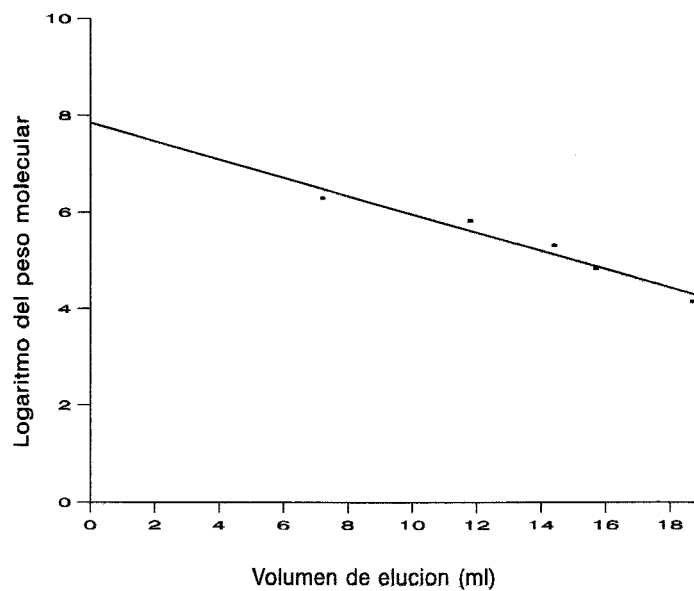
III.3.8. Digestibilidad proteica *in vitro*.

Se midió mediante el sistema multienzimático descrito por Hsu *et al.* (1977). Muestras con un contenido de 62.5 mg de proteína se suspendieron en 10 ml de agua destilada, ajustándose el pH a 8.0 y la temperatura a 37°C. Se les añadió, en una relación 1:10 v/v, una solución enzimática a pH 8.0 que contenía 1.6 mg de tripsina, 3.1 mg de α -quimotripsina y 1.3 mg de peptidasa por ml. El pH de la mezcla se midió a los 10 min, calculándose el porcentaje de proteína digerida *in vitro* mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína digerida (\%)} = 210.464 - 18.103 \times \text{pH}$$

III.3.9. Estimación de los pesos moleculares de las proteínas mediante cromatografía de filtración en gel.

La columna utilizada fue una Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia Biotech.) cuyo rango de separación es entre 5 y 5000 KDa. La columna se calibró con proteínas de pesos moleculares conocidos (ver apartado III.2.2.). A partir de los logaritmos de los pesos moleculares de estas proteínas y de sus volúmenes de elución (V_e), se realizó la recta de calibración (Figura 11).



$$\text{Log PM} = 7.86 - 0.19 \times V_e \text{ (ml)}$$
$$r = -0.9741$$

Figura 11. Recta de calibración obtenida para la determinación de los pesos moleculares de las proteínas mediante filtración en gel Superose 6.

La elución se llevó a cabo con 50 ml de tampón borato sódico 0.1 M, cloruro sódico 0.2 M, azida sódica 0.02% a pH 8.3, con un flujo de 0.4 ml por min. Las muestras, antes de inyectarlas en columna, se purificaron eluyéndolas a través de columnas PD-10 para eliminar los compuestos no proteicos. El volumen inyectado de las muestras y la concentración de las mismas fueron 200 μ l y 1.6 mg de proteína por ml, respectivamente. La separación de las proteínas se registró midiendo su absorbancia a 280 nm.

III.3.10. Electroforesis.

Las electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se desarrollaron de acuerdo al protocolo descrito por Laemmli (1970), usándose geles de 0.75 mm de espesor. La composición, en porcentaje de volúmenes, de los geles fue:

	<u>Gel de concentración</u>	<u>Gel de separación</u>
Acrilamida 45%	--	44.5
Acrilamida 30%	9.9	--
Bisacrilamida 1%	9.9	23.5
Tampón TRIS 0.25 M, SDS 0.2%, pH 6.8	49.4	--
Tampón TRIS 1.5 M, SDS 0.4%, pH 8.8	--	25.4
Agua destilada	29.6	6.0
TEMED	0.1	0.1
Persulfato amónico 10%	1.0	0.4

La concentración en acrilamida total (acrilamida+bisacrilamida) de los geles de concentración y separación fueron de un 3.1% y un 20.3%, respectivamente. La separación de las proteínas se realizó a una intensidad de corriente constante de 20 mA, tiñéndose los geles con Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva). Las muestras para electroforesis se purificaron mediante columnas PD-10, mezclándolas posteriormente en una proporción 1:1 v/v con un tampón de solubilización cuya composición se muestra a continuación:

Clorhidrato de TRIS	80 mM
AEDT	0.57%
DTT	0.26%
SDS	3.3%
Azul de Bromofenol	0.008%
Sacarosa	20%

pH 6.8

Posteriormente se les añadió 2-mercaptoetanol (Merck) al 5% v/v y calentaron en agua hirviendo durante 3 min. El tampón electrolito empleado estaba compuesto por TRIS 0.025 M, Glicina 0.19 M, SDS 0.1% pH 8.4. La determinación de los pesos moleculares de las proteínas se realizó para cada gel mediante rectas de calibración en las que se representaron las movilidades relativas de proteínas patrón frente a los logaritmos de sus pesos moleculares.

Las electroforesis nativas (PAGE) se realizaron en geles de 0.75 mm de espesor. La composición de los geles, en porcentaje de volúmenes, fue la siguiente:

	<u>Gel de concentración</u>	<u>Gel de separación</u>
Acrilamida 30%	12.8	25.8
Bisacrilamida 1%	11.2	21.2
Tampón TRIS 0.25 M, pH 6.8	25.2	--
Tampón TRIS 1.5 M, pH 8.8	--	25.3
Agua destilada	49.8	27.1
TEMED	0.1	0.1
Persulfato amónico 10%	0.9	0.4

La concentración en acrilamida total de los geles de concentración y de separación fueron 4.0% y 8.0%, respectivamente. La separación de las proteínas se realizó a una intensidad de corriente constante de 10 mA y la tinción de los geles se hizo como anteriormente. Las muestras para electroforesis se mezclaron 1:1 v/v con un tampón de solubilización compuesto por TRIS 62 mM, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.01%, pH 6.8. El tampón electrolito fue el mismo usado para las SDS-PAGE excepto que no contenía SDS.

III.3.11. Determinación cuantitativa de aminoácidos.

Se llevó a cabo según el método publicado por Alaiz *et al.* (1992). Las muestras se hidrolizaron en tubos con cierre y bajo atmósfera de nitrógeno con HCl 6N a 110°C durante 24 hr. Tras la hidrólisis, las muestras se llevaron a sequedad en el rotavapor y se redisolvieron con tampón borato sódico 1M, azida sódica 0.02% pH 9.0, llevándolas a un volumen conocido. La derivatización de los aminoácidos se hizo a 50°C durante 50 min con un exceso de etoximetilenmalonato de dietilo (Fluka, Buchs, Suiza). La separación de los aminoácidos se llevó a cabo mediante HPLC con una columna Nova Pack C₁₈ 4µm de fase inversa (Waters) de 300 x 3.9 mm, usándose un sistema de gradiente binario con acetato sódico 25 mM, azida sódica 0.02% pH 6.0 (A) y acetonitrilo (B) como disolventes. El flujo fue de 0.9 ml/min y la programada usada: tiempo 0-3 min gradiente lineal desde A:B (91:9) hasta A:B (86:14); tiempo 3-13 min elución con A:B (86:14); tiempo 13-30 min gradiente lineal desde A:B (86:14) hasta A:B (69:31); tiempo 30-35 min elución con A:B (69:31). Como patrón interno se utilizó D,L- α -aminobutírico (Sigma Chemical Co.), calculándose el contenido de cada aminoácido a partir de rectas de calibración construidas para cada uno de ellos. Los aminoácidos utilizados para hacer las rectas de calibración se sometieron a las mismas condiciones que las muestras para evitar los errores producidos por la pérdida de algunos aminoácidos durante la hidrólisis ácida. Los resultados se expresaron en gramos de aminoácido por cada 100 g de proteína.

III.3.12. Harina de garbanzo desengrasada.

Las semillas de garbanzo se trituraron en una picadora doméstica y desengrasaron con hexano en un sohxlet durante 9 hr. Una vez evaporado el hexano, la harina desengrasada se molió en un molinillo doméstico y tamizó para conseguir un tamaño de partícula homogéneo. Esta harina ha sido utilizada como material de partida para la determinación del pI de las proteínas del garbanzo, la elaboración de los aislados proteicos y para la clasificación de las proteínas del garbanzo.

III.3.13. Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas del garbanzo.

Se extrajeron 15 g de harina de garbanzo con 300 ml de una solución de NaOH 0.2% durante 1 hr. Tras centrifugar el extracto a 8000 x g, y recuperar el sobrenadante, la harina se volvió a extraer con otros 300 ml. De nuevo se centrifugó, juntándose ambos sobrenadantes. Del sobrenadante total se tomaron alícuotas de 40 ml que, ajustadas a distintos pH desde 2.5 hasta 6.5 en intervalos de 0.5, se centrifugaron 15 min a 4000 x g. Se recuperaron los sobrenadantes a los que se les midió el contenido en nitrógeno. El pI de las proteínas se calculó a partir de una gráfica en la que se representó el porcentaje de nitrógeno en los sobrenadantes (respecto al nitrógeno total extraído) frente a las diferentes unidades de pH.

III.3.14. Obtención de aislados proteicos.

Se prepararon dos tipos de aislados que se denominaron A y B (Figura 12).

Aislado A.- La harina de garbanzo se extrajo con NaOH 0.2% en una relación 1:10 p/v durante 1 hr. Después de centrifugar el extracto 15 min a 8000 x g, el sobrenadante se recuperó y el

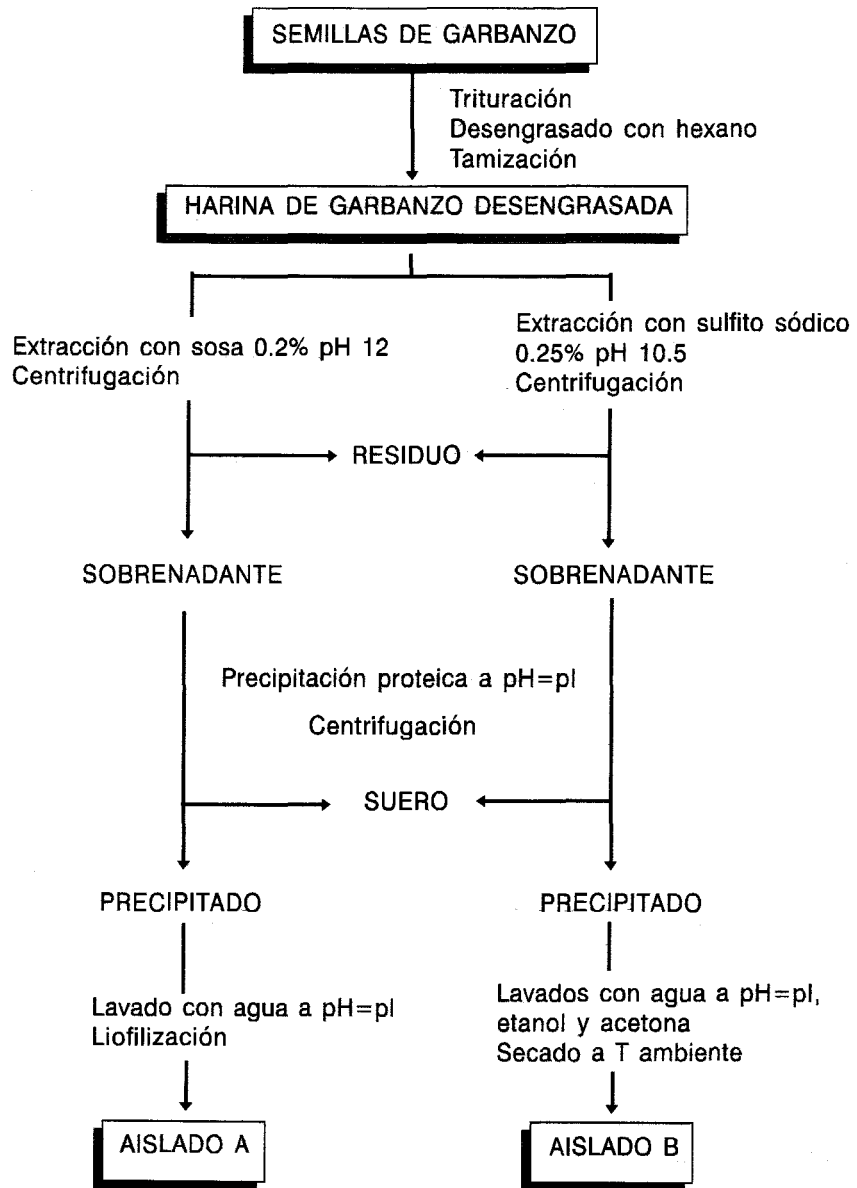


Figura 12 . Preparación de los aislados proteicos A y B a partir de las semillas de garbanzo.

precipitado se extrajo sucesivamente dos veces más con la mitad de volumen de solución alcalina. A la harina de garbanzo extraída, secada en estufa a 50°C y pesada, así como a los sobrenadantes, se les midió el contenido en nitrógeno. Los distintos sobrenadantes, una vez llevados al punto isoeléctrico de las proteínas del garbanzo (pI 4.3), se centrifugaron como antes. A los nuevos sobrenadantes se les midió el nitrógeno. Los precipitados, reunidos y suspendidos en agua destilada a pH 4.3, se centrifugaron en las mismas condiciones que anteriormente para eliminar los restos de sales y de otros compuestos no proteicos. Finalmente, los proteínas precipitadas se congelaron a -20°C y liofilizaron.

Aislado B.- Se preparó siguiendo el mismo esquema anterior, con las diferencias de que el medio de extracción de las proteínas fue Na₂SO₃ al 0.25% a pH 10.5 y de que las proteínas se lavaron, además de con agua destilada a pH 4.3, con etanol 96% y con acetona. El aislado se secó a temperatura ambiente.

III.3.15. Clasificación de las proteínas según su solubilidad.

Se llevó a cabo utilizando el método de Singh *et al.* (1988). La harina de garbanzo se extrajo 3 veces sucesivas con tampón borato sódico 0.1M pH 8.3 durante 1 hr en una relación 1:10 p/v. Los extractos se centrifugaron 15 min a 8000 x g, la harina extraída se secó a 50°C en estufa, midiéndose su contenido en nitrógeno. Los sobrenadantes una vez reunidos, se dializaron con una membrana de 12 KDa (Sigma) durante 15 hr frente a tampón citrato sódico 25 mM pH 4.6. Tras centrifugar en las condiciones anteriores, las albúminas permanecieron solubles mientras que las globulinas precipitaron. Las globulinas se redisolviéron en tampón borato sódico 0.1 M, cloruro sódico 0.2 M pH 8.3 y se volvieron a dializar en las mismas condiciones frente al mismo tampón citrato. Después de centrifugar, el legumín precipitó y el vicilín quedó en el sobrenadante (Figura 13).

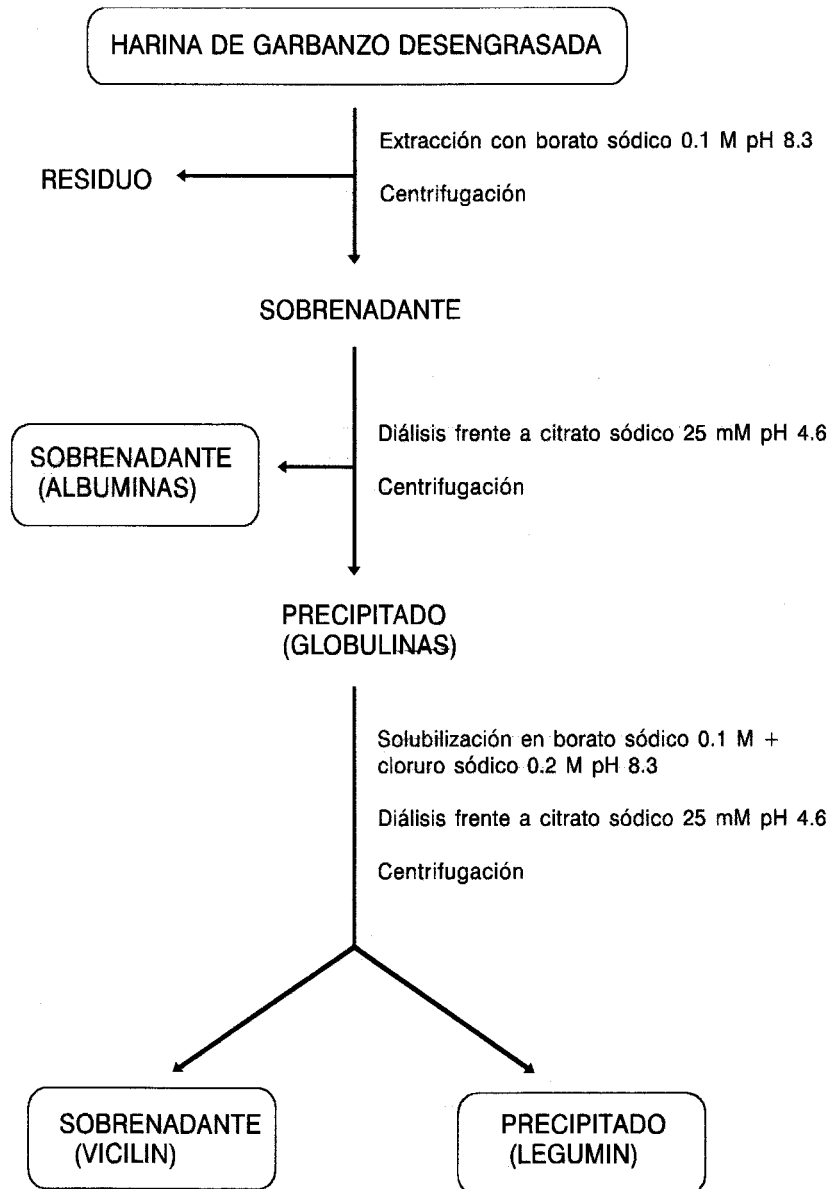


Figura 13. Fraccionamiento de las proteínas del garbanzo en albúminas, vicilín y legumín según el método de Singh *et al.* (1988).

III.3.16. Extracción y purificación de los lípidos asociados a la harina y a los aislados proteicos del garbanzo.

Los lípidos se extrajeron con etanol al 86% en agua a temperatura ambiente durante 36 hr, en una relación muestra/disolvente de 1:20 (Nash *et al.*, 1967). El extracto se filtró a vacío. El filtrado, una vez concentrado a 1/3 de su volumen, se filtró de nuevo para eliminar las lipoproteínas, y se transfirió a un embudo de decantación. Se realizaron dos extracciones líquido-líquido con una mezcla cloroformo:cloruro sódico acuoso 0.5% (1:1) para eliminar los componentes no lipídicos (Singh y Privett, 1970). La disolución clorofórmica se pasó a través de un papel de filtro con sulfato sódico anhidro para eliminar los restos de agua, evaporándose el cloroformo en rotavapor y con nitrógeno. Los lípidos se pesaron y refirieron a la muestra de partida en tanto por ciento p/p

III.3.17. Reactivos para la detección de lípidos en cromatografía en capa fina.

Se usaron distintos reactivos según los fines perseguidos:

a) *Vapores de yodo.* Se introduce la placa de sílice en una cubeta saturada en yodo. Tiñe todos los lípidos de color amarillo-marrón. No destruye la muestra siempre que el yodo se elimine rápidamente en corriente de nitrógeno.

b) *Acido sulfúrico al 50% en agua.* Se rocía la placa con esta solución y luego se quema a 200-300°C, carbonizándose todos los lípidos. Los glucolípidos así como los lípidos que contienen moléculas de esteroles se visualizan como manchas de color púrpura antes de quemarse. Destructivo.

c) *Reactivo de Vaskovsky y Kostetsky (1968).* Es específico para fosfolípidos que aparecen

como manchas azules cuando se rocían con este reactivo. El reactivo se preparó de la siguiente forma: 4 g de molibdato amónico se agitan con 30 ml de agua durante 1 hr y se filtran (Solución I). Se agitan, durante 30 min, 20 ml de la Solución I + 10 ml de HCl concentrado + 2.5 ml de mercurio, se filtra (Solución II). Se mezclan 50 ml de ácido sulfúrico con la Solución II y el resto de la Solución I, enfriándose y diluyendo hasta 250 ml. Destructivo.

d) Ninhidrina al 0.2% en etanol. Se rocía la placa con esta solución y posteriormente se calienta a 80-100°C en estufa. Los lípidos con grupos amino primario aparecen como manchas púrpura. Destructivo.

e) 2,7-diclorofluoresceína al 0.2% en etanol. Las placas se pulverizan con esta solución apareciendo los lípidos como manchas rojo-naranja. No destructivo.

III.3.18. Separación e identificación de las distintas clases de lípidos.

Una vez extraídos y purificados los lípidos, se procedió a su fraccionamiento preliminar mediante cromatografía en columna de Florisil 60-100 mesh (Merck) y cromatografía en capa fina (CCF). La columna de Florisil de 2.9 x 22 cm se equilibró con 300 ml de cloroformo ajustándose un flujo aproximado de 0.5 ml/min. La cantidad de muestra depositada fue de unos 400-500 mg que se eluyó sucesivamente con cloroformo, cloroformo:acetona (1:1) y metanol para recuperar los lípidos neutros, glucolípidos y fosfolípidos, respectivamente. Las fracciones recogidas fueron de 8 ml y la elución de la columna se siguió mediante CCF. También se usó, como método alternativo al Florisil, la separación de los lípidos neutros y polares por medio de la CCF preparativa. Para ello se depositó la muestra en una placa de silicagel 60G de 20 x 20 cm y 0.50 mm de espesor que se desarrolló con una mezcla de hexano: éter dietílico: ácido fórmico (80:20:1). De esta forma, los lípidos polares permanecen en el origen mientras que los lípidos neutros migran a lo largo de la placa. Tras desarrollar la placa, se rascó la sílice que se eluyó en columnas con cloroformo para obtener los lípidos neutros

y con cloroformo:metanol (2:1) para recuperar los lípidos polares.

La separación definitiva de los lípidos en sus diferentes clases se llevó a cabo mediante CCF. Los líquidos de desarrollo de las placas de sílice fueron:

a) Para los lípidos neutros se usó:

- Hexano 100% para separar los hidrocarburos.

- Mezclas hexano: éter dietílico: ácido fórmico en las relaciones 95:5:1 para las ceras, 80:20:1 para triglicéridos (TAG) y ácidos grasos libres (AGL) y 50:50:1 para esteroides libres, alcoholes grasos y diglicéridos (DAG).

b) Para los lípidos polares se empleó cloroformo: metanol: amoníaco 7 N en las proporciones 100:15:2 y 90:25:2 así como cloroformo: metanol: ácido acético: agua en la relación 85:15:10:3.

c) La CCF bidimensional de la fosfatidilcolina (FC) se realizó con cloroformo: metanol: amoníaco 7 N (90:25:2) en la 1ª dimensión, y cloroformo: metanol: ácido acético: agua (85:15:10:3) en la 2ª dimensión.

La identificación tentativa de las clases de lípidos se realizó por la comparación de sus factores de retención en CCF con los de los patrones, así como por su visualización con los distintos reactivos de detección descritos en el apartado anterior. En la Figura 14 se muestra el esquema seguido para extraer, purificar y separar los lípidos presentes en la harina de garbanzo y en los aislados proteicos. La identificación definitiva se llevó a cabo mediante CG y el análisis de los productos de hidrólisis de algunos lípidos.

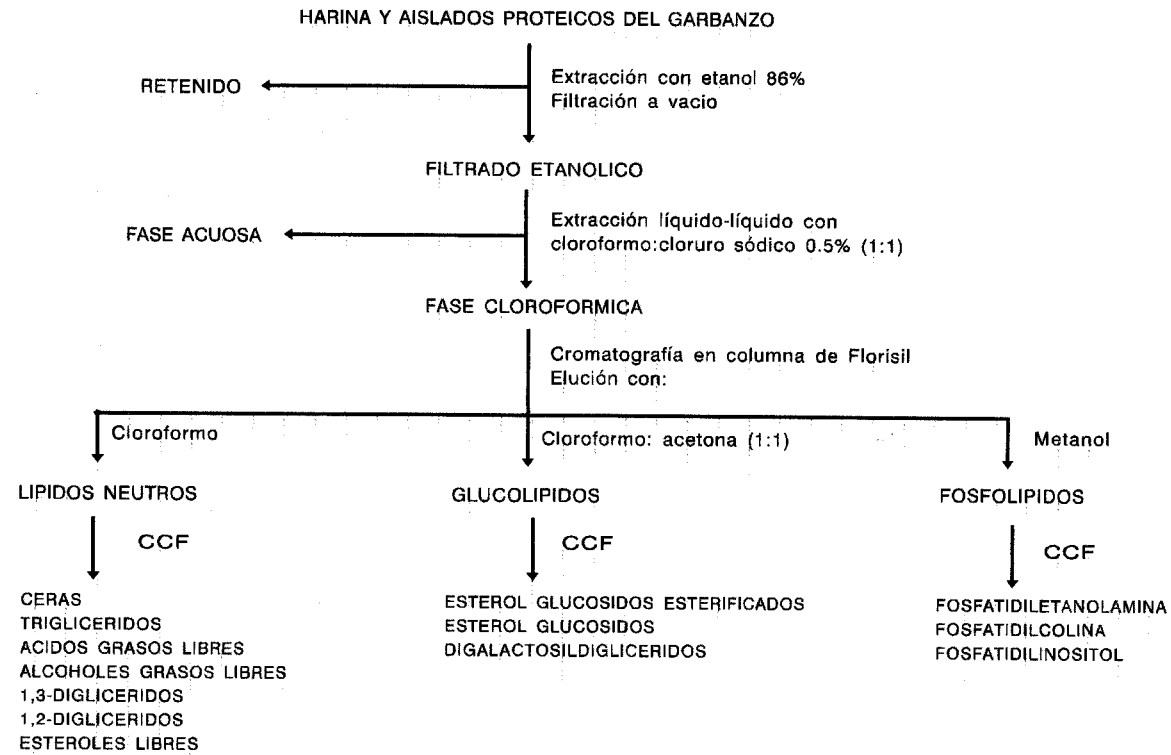
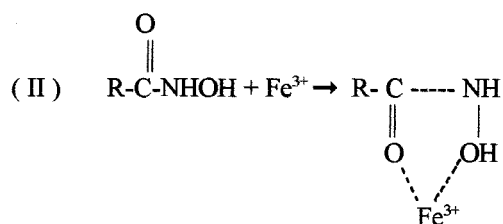
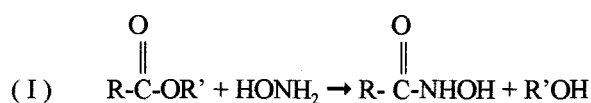


Figura 14. Extracción, purificación y separación de las distintas clases de lípidos presentes en la harina y en los aislados proteicos del garbanzo.

III.3.19. Determinación cuantitativa de las clases de lípidos.

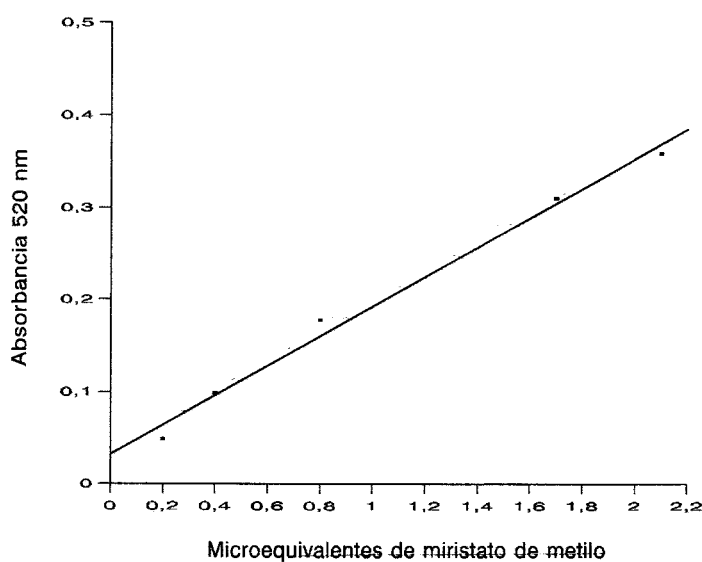
Inicialmente se separaron los lípidos (11-12 mg) mediante CCF en neutros y polares, como se ha mencionado en el apartado anterior, determinándose sus porcentajes en peso por gravimetría. La cuantificación de las distintas clases de lípidos se realizó por el método de Vioque y Holman (1962), excepto los esteroides libres y los esteroides glucósidos (EG), que se determinaron por el procedimiento de Huang *et al.* (1961) y los alcoholes grasos que se cuantificaron mediante el uso de un patrón interno. El método de Vioque y Holman se basa en la reacción de los ésteres de los ácidos grasos con la hidroxilamina para producir sus correspondientes ácidos hidroxámicos, los cuales, al reaccionar con el Fe^{3+} , forman un complejo que tiene su máximo de absorción a 520 nm:



(520 nm)

Primeramente, los lípidos separados en CCF se rascan y depositan en tubos de ensayo. Se añade a cada tubo 1 ml de la solución filtrada de una mezcla de volúmenes iguales de NaOH (4 g disueltos en 2.5 ml de agua y llevados a 50 ml con etanol absoluto) y de clorhidrato de hidroxilamina (2 g disueltos en 2.5 ml de agua y llevados a 50 ml con etanol absoluto). Se incuban las muestras a 65-70°C durante 5 min y, tras enfriar, se les añaden 2.5 ml de una solución de Fe^{3+} . Después de transcurridos 15 min, se filtran las muestras y se mide la absorbancia a 520 nm frente

a un blanco preparado de igual manera a partir de sílice limpia. La solución de Fe^{3+} se preparó disolviendo 1.94 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en 5 ml de HCl concentrado a los que se añadió 5 ml de ácido perclórico al 70%; se evaporó casi a sequedad y diluyó finalmente hasta 100 ml con agua. A 0.5 ml de esta solución se le añadió 0.25 ml de perclórico 70% y llevó a 50 ml con etanol del 96%. Se añadieron 2.5 ml de ácido nítrico concentrado para que el color obtenido fuera estable. La determinación cuantitativa se realizó mediante una recta de calibración construida a partir de una solución de 5 mg de miristato de metilo por ml de cloroformo, de la cual, se depositó en placa 10, 20, 40, 80 y 100 μl (Figura 15). Los resultados se expresaron como porcentajes en peso a partir de los pesos medios de las distintas clases de lípidos. En el caso de los ácidos grasos libres hay que metilarlos previamente para poderlos cuantificar.

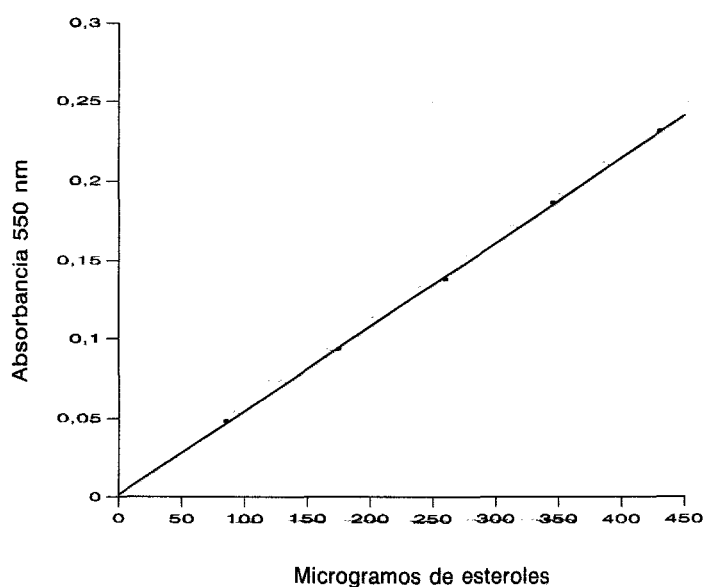


$$A = 0.0263 + 0.1656 \times \mu\text{eq miristato de metilo}$$

$$r = 0.9970$$

Figura 15. Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de los ésteres de los ácidos grasos.

Para la determinación de las cantidades de esteroides libres y EG, se separaron los lípidos en CCF y la sílice se eluyó sobre tubos de ensayo. Se evaporó el disolvente y añadió a cada muestra 200 μ l de ácido acético glacial y 3 ml del reactivo formado por 30 ml de ácido acético glacial, 60 ml de anhídrido acético, 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y sulfato sódico al 2%. Transcurridos 55 min se midieron las absorbancias a 550 nm. La recta de calibración se preparó a partir de una solución de 2.16 mg de esteroides vegetales por ml de ácido acético (Figura 16).



$$A = 0.0023 + 0.00053 \times \mu\text{g esteroides}$$

$$r = 0.9999$$

Figura 16. Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de los esteroides.

Los alcoholes grasos se cuantificaron añadiendo 2.5 μ g de alcohol $C_{21:0}$ a muestras de 0.56-1.14 g de lípidos neutros. Estas muestras se metilaron, y los alcoholes grasos se separaron por CCF, derivatizaron, e inyectaron en el cromatógrafo de gases. El porcentaje en peso de los alcoholes se calculó a partir del área del alcohol $C_{21:0}$.

III.3.20. Análisis de los ácidos grasos.

Se determinaron mediante CG como ésteres metílicos de ácidos grasos. La derivatización se llevó a cabo añadiendo a las muestras 2 ml del reactivo de metilación compuesto por H_2SO_4 al 2.5% en metanol anhidro: benceno (9:1) y calentando en estufa a $75^\circ C$ durante 2 hr. Una vez enfriada la muestra, se le añadió 1 ml de hexano y 1 ml de NaCl al 5% en agua, agitando a continuación fuertemente. Se dejó que se separaran las dos fases y la fase orgánica se inyectó en el cromatógrafo de gases. La columna utilizada fue una HP 20M 25 m longitud x 0.2 mm D.I. x $0.2 \mu m$ de espesor de fase (Hewlett Packard). La temperatura del inyector y la del detector fueron 225 y $250^\circ C$, respectivamente, y la del horno se mantuvo a $170^\circ C$. Los porcentajes de los distintos ácidos grasos se calcularon directamente a partir de los porcentajes de sus áreas.

II.3.21. Análisis de los esteroides.

Los esteroides libres, así como los que se liberan en la hidrólisis de los EG y esteroles glucósidos esterificados (EGE), se analizaron por CG transformándolos previamente en derivados de silano. La reacción de derivatización se llevó a cabo añadiendo a las muestras de esteroides 20 μl de una mezcla de piridina: hexametildisilano: trimetilclorosilano (9:3:1). La reacción es inmediata a temperatura ambiente. La columna empleada fue una TRB-1 30 m longitud x 0.25 mm D.I. x $0.25 \mu m$ de espesor de fase (Supelco). La temperatura del inyector y la del detector se fijaron a $300^\circ C$ mientras que la del horno se mantuvo a $265^\circ C$. Los porcentajes de los distintos esteroides se calcularon directamente a partir de los porcentajes de sus áreas.

III.3.22. Análisis de los alcoholes grasos.

Los alcoholes grasos libres, así como los que forman parte de las ceras, se determinaron por CG. En el caso de las ceras, primeramente se metilaron, según el procedimiento descrito en el apartado III.3.21. Se depositó luego la fase orgánica en una placa de silicagel, desarrollándose

con hexano: éter dietílico: ácido fórmico (50: 50: 1) para separar los ésteres metílicos de los ácidos grasos y los alcoholes grasos de las ceras. Los alcoholes grasos se derivatizaron como los esteroides. La columna utilizada fue una columna TRB-1 30 m longitud x 0.25 mm D.I. x 0.25 μ m de espesor de fase (Supelco). La temperatura del inyector y la del detector se fijaron a 300°C mientras que la del horno siguió la siguiente programada: 200°C durante 6 min, gradiente de 3°C por min hasta los 280°C y, finalmente, 15 min a esta temperatura. Los porcentajes de cada alcohol graso se calcularon directamente a partir de los porcentajes de sus áreas.

III.3.23. Hidrólisis de los glucolípidos.

Las muestras de glucolípidos se depositaron en tubos con cierre, añadiéndoles 2 ml de HCl 2.5% en metanol. Se introdujo N₂ en los tubos y calentaron a 70°C durante 2hr (Kates, 1986b). Una vez enfriada la muestra, se añadió 1 ml de agua destilada, 1 ml de cloroformo y se agitó, dejando separar ambas fases. De esta manera, en la fase metanol-agua se encuentran los azúcares y en la fase clorofórmica, según el glucolípido en cuestión: esteroides libres si es un EG, esteroides libres y ésteres metílicos de los ácidos grasos si es un EGE, y ésteres metílicos de los ácidos grasos si es un digalactosildiglicérido (DGDG).

III.3.24. Identificación de los azúcares presentes en los glucolípidos.

La fase metanol-agua, procedente de la hidrólisis de los glucolípidos, se llevó a sequedad con nitrógeno. Los azúcares se redujeron a sus correspondientes alditoles añadiendo 500 μ l de borohidruro sódico 0.3 M, dejándolos a temperatura ambiente durante 3 hr. El exceso de borohidruro se destruyó con unas gotas de ácido acético para posteriormente pasar las muestras a través de una columna de Amberlita IR-120 (H⁺), activada con HCl 2N, para eliminar los iones Na⁺. La muestra se eluyó con 20 ml de agua destilada (5 volúmenes de columna), se congeló a -20°C y liofilizó. Los liofilizados se recuperaron con 20 ml de metanol seco que se evaporó en rotavapor a 40°C. Una vez seca la muestra, se volvió a añadir 20 ml de metanol seco, repitiéndose

la operación 4 veces más. Esto se hizo para eliminar el ácido bórico como trimetilborato, que es volátil. Finalmente, a la muestra seca se le añadió 25 μ l de piridina y 25 μ l de anhídrido acético y calentó a 90-100°C durante 1hr, derivatizándose los alditoles a acetatos de alditol que se analizan por CG (Millán *et al.*, 1984). La columna empleada fue una TRB-1 30 m longitud x 0.25 mm D.I. x 0.25 μ m de espesor de fase (Supelco). La temperatura del inyector, detector y horno se fijaron a 250, 300 y 170°C, respectivamente.

III.3.25. Hidrólisis de los fosfolípidos.

Las muestras de fosfolípidos, depositadas en tubos con cierre, se hidrolizaron agregándoles 2 ml de HCl 1.7 N en metanol y calentándolas a 100°C durante 4hr (Dawson, 1960). Tras la hidrólisis, las muestras se llevaron a sequedad en rotavapor a 60-70°C y los productos de hidrólisis se extrajeron con 1 ml de HCl acuoso 0.1 N.

III.3.26. Identificación de los productos de hidrólisis de los fosfolípidos.

La etanolamina se analizó mediante HPLC. El producto de la hidrólisis de la fosfatidiletanolamina (FE), una vez llevado a sequedad, se redisolvió en 3 ml de tampón borato sódico 1M, azida sódica 0.02% pH 9.0 y se le añadió 2 μ l de etoximetilenmalonato de dietilo, siguiéndose a partir de aquí el mismo método que se usó para el análisis de aminoácidos. La etanolamina se identificó por comparación de su tiempo de retención con el del producto patrón.

El inositol se determinó mediante CG. El producto de hidrólisis del fosfatidilinositol (FI) tras llevarlo a sequedad, se hizo reaccionar con 25 μ l de piridina y 25 μ l de anhídrido acético a 100°C durante 1hr. El inositol acetilado se analizó siguiendo el método usado para los azúcares de los glucolípidos, y la identificación se realizó por comparación de su tiempo de retención con el del producto patrón.

III.3.27. Purificación de la proteína legumín.

III.3.27.1. Fraccionamiento preliminar.

Se partió de 100 g de semillas de garbanzo que se trituraron con una picadora doméstica y se homogeneizaron con un tamiz. Esta harina se sometió al fraccionamiento proteico de Singh *et al.* (1988), recuperándose la fracción de legumín que se congeló (-20°C) y liofilizó. El liofilizado se redisolvió con tampón borato sódico 0.1 M, cloruro sódico 0.2 M pH 8.3 en una relación 1:20 p/v, y se centrifugó a 8600 x g para eliminar los restos de proteína no solubilizada, que quedaron en el precipitado. El sobrenadante se pasó por una columna PD-10, eluyéndola con tampón fosfato sódico 0.19 M, citrato sódico 0.019 M, azida sódica 0.02% pH 7.0. Esta solución de legumín se purificó por intercambio aniónico.

III.3.27.2. Intercambio aniónico.

Se llevó a cabo mediante la columna Protein Pak DEAE 8 HR 1000Å 8µm (Waters) acoplada al equipo FPLC. La elución se realizó con un sistema de dos tampones: uno de baja fuerza iónica (A) compuesto por fosfato sódico 0.19 M, citrato sódico 0.019 M, azida sódica 0.02% pH 7.0, y un segundo tampón de mayor fuerza iónica (B) con la misma composición y pH pero con un contenido 0.5 M en cloruro sódico. El flujo de la columna fue de 1 ml/min, y el volumen de inyección y la concentración de las muestras fueron 10 ml y 18 mg de proteína por ml, respectivamente. La separación de las proteínas se realizó con la siguiente programada:

<u>Volumen(ml)</u>	<u>Concentración tampón B(%)</u>
0-25	0
25-35	0-20
35-45	20
45-55	20-50
55-60	50
60-65	50-100
65-70	100

La purificación del legumín se siguió mediante SDS-PAGE.

III.3.27.3. Filtración en gel.

El legumín purificado por intercambio aniónico se separó mediante filtración en gel en una columna de 74 x 2.6 cm rellena con Sephacryl S-300 (Pharmacia Biotech.). Como eluyente se usó tampón borato sódico 0.1 M, cloruro sódico 0.2 M, azida sódica 0.02% pH 8.3, con un flujo de 0.7 ml/min. El volumen de muestra inyectado fue de 5 ml y la concentración de las mismas osciló entre 20 y 30 mg de proteína por ml. La purificación se siguió por PAGE y SDS-PAGE.

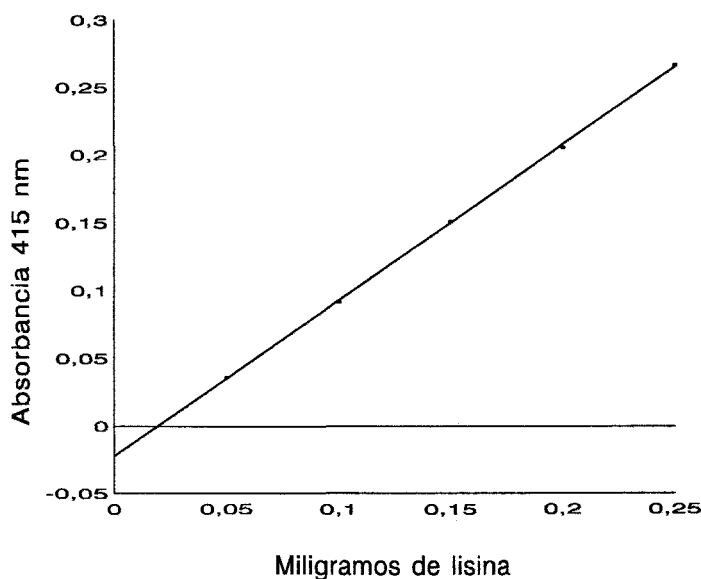
III.3.28. Incubación proteína-lípido.

Se incubó la proteína legumín con ácido linoleico, L- α -fosfatidilcolina de soja (Sigma Chemical Co.) y trilinoleína (Nu Chek) en una relación proteína:lípido 1:2 p/p en tampón borato sódico 0.2 M, TRITON X-100 0.03% pH 9.0. La mezcla proteína-lípido se sonicó 10 min, se le burbujeó aire durante 15 min e incubó a 37°C en baño de agua a distintos tiempos.

III.3.29. Lisina asimilable.

La lisina asimilable o disponible es aquella en la cual su grupo ϵ -amino está libre. Se midió según el método descrito por Kakade y Liener (1969) que se basa en la reacción del grupo amino con el TNBS para formar un compuesto coloreado que se determina espectrofotométricamente. A las muestras (250 μ l) se les añadió 250 μ l de bicarbonato sódico 1 M y 500 μ l de TNBS al 1% en agua. Se calentaron a 40°C durante 75 min en oscuridad. Posteriormente, se hidrolizaron con 1.5 ml de HCl 11 N a 100°C durante 2 hr. Tras enfriar, se diluyeron con 2.5 ml de agua. Se tomaron 2.5 ml de muestra que se extrajo 2 veces con 2.5 ml de éter dietílico, eliminándose la fase orgánica en la cual van disueltos los compuestos de reacción entre el TNBS y los α -amino de los aminoácidos. En la fase acuosa permanecen las lisinas unidas a través del ϵ -amino al TNBS. Se

midió la absorbancia de la fase acuosa a 415 nm. La determinación cuantitativa de la lisina asimilable se hizo a partir de una recta de calibración realizada a partir de una solución de 625 µg de L-monoclorhidrato de lisina por ml (Figura 17).



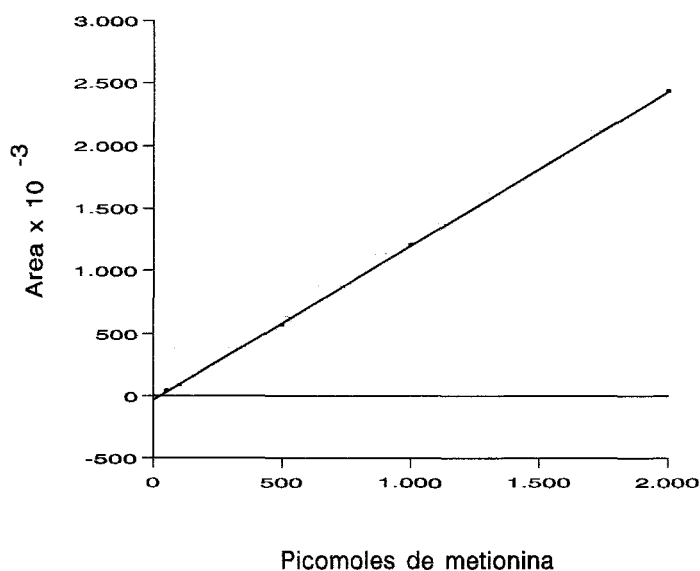
$$A = -0.0222 + 1.1500 \times \text{mg lisina}$$
$$r = 0.9999$$

Figura 17. Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de la lisina asimilable.

III.3.30. Determinación cuantitativa de aminoácidos alterados.

Se cuantificaron de igual forma que el resto de las muestras de aminoácidos pero con una serie de modificaciones para evitar que los aminoácidos alterados por los lípidos oxidados reviertan a su estructura química original. Estas modificaciones fueron:

1.- Hidrólisis de las proteínas con KOH 5 N a 110°C 16 hr para cuantificar la metionina (Schachter *et al.*, 1963). Tras la hidrólisis, el pH de las muestras se ajustó a 8.5-10.5, se filtraron y se les añadió el reactivo de derivatización. Como la hidrólisis de las proteínas fue básica, se realizó una recta de calibración para la metionina, haciéndole el mismo tratamiento alcalino que a las muestras. Esta recta de calibración, preparada a partir de una solución de 0.4 mg de L-metionina por ml, se muestra en la Figura 18.



$$\text{Area} = -27142 + 1229.8 \times \text{pmoles metionina}$$

$$r = 0.9999$$

Figura 18. Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de la metionina mediante hidrólisis alcalina de las proteínas y HPLC.

2.- Reducción de las muestras, previo a la hidrólisis ácida, para cuantificar la histidina. Esto se hizo añadiendo un exceso de borohidruro sódico e incubando a 37°C 15 min (Alaiz y Girón, 1994).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1. Clasificación de las proteínas del garbanzo según su solubilidad.

Tradicionalmente, desde que en 1897 Osborne y Campbell desarrollaran su método de fraccionamiento, las proteínas se han clasificado en albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas, según sean solubles en agua destilada, soluciones salinas, mezclas hidroalcohólicas o soluciones alcalinas, respectivamente. Este método, a pesar de su antigüedad, sigue siendo citado y empleado en numerosas publicaciones (Guéguen *et al.*, 1996). No obstante, su eficacia en la separación de albúminas y globulinas en leguminosas ha sido cuestionada (Deshpande y Nielsen, 1987). Actualmente, son muy numerosos los métodos utilizados para la separación de las proteínas de garbanzo a partir de la distinta solubilidad que éstas presentan a diferentes valores de pH y fuerza iónica (Vairinhos y Murray, 1982a; Siddiqui, 1983; Singh *et al.*, 1988). Las proteínas (albúminas + globulinas) se suelen extraer en un medio salino a un pH entre 7.0 y 8.5, para posteriormente, someterlas a una diálisis frente a agua destilada o un tampón de baja fuerza iónica con un pH entre 4.1 y 4.7. De esta forma, se produce una precipitación selectiva de las globulinas, que no son solubles en estos tampones de diálisis, mientras que las albúminas permanecen en el sobrenadante.

De entre todos los métodos descritos en la literatura para la separación de las proteínas según su solubilidad, se eligió el de Singh *et al.* (1988), que además de diferenciar albúminas de globulinas, separa éstas últimas en legumín y vicilín.

Los porcentajes obtenidos para cada una de estas fracciones aparecen en la Tabla 3. Legumín apareció como la fracción mayoritaria (64.3%) en la semilla de garbanzo con unos porcentajes similares a los obtenidos en otras variedades (Singh *et al.*, 1988). La proteína legumín u 11S del garbanzo está constituida por 6 subunidades $\alpha\beta$ unidas por enlaces no covalentes y organizadas en un antiprisma trigonal (Figura 19). En este modelo los polipéptidos α , de carácter más hidrofílico, se localizan en la periferia de la molécula, mientras que los polipéptidos β constituyen el corazón hidrófobo de la proteína. Las cadenas α y β están unidas entre sí por puentes disulfuro, oscilando el peso molecular del legumín entre 315-398 KDa, según la leguminosa de que se trate (Gueguen *et al.*, 1996). En el caso del garbanzo se han determinado unos pesos moleculares de 32-35 KDa para las cadenas α y 23 KDa para las β (Kumar y

Tabla 3. Clasificación de las proteínas del garbanzo, basada en su solubilidad, según el método de Singh *et al.* (1988). Los datos están expresados como porcentaje del nitrógeno total de las semillas.

Fracción proteica	Porcentaje
Albúminas	16.0 ± 0.6 ^a
Vicilín	1.9 ± 0.1
Legumín	64.3 ± 0.6
Nitrógeno no extraído	17.8 ± 2.4

a: Los datos son la media ± desviación estandar de 2 experimentos independientes.

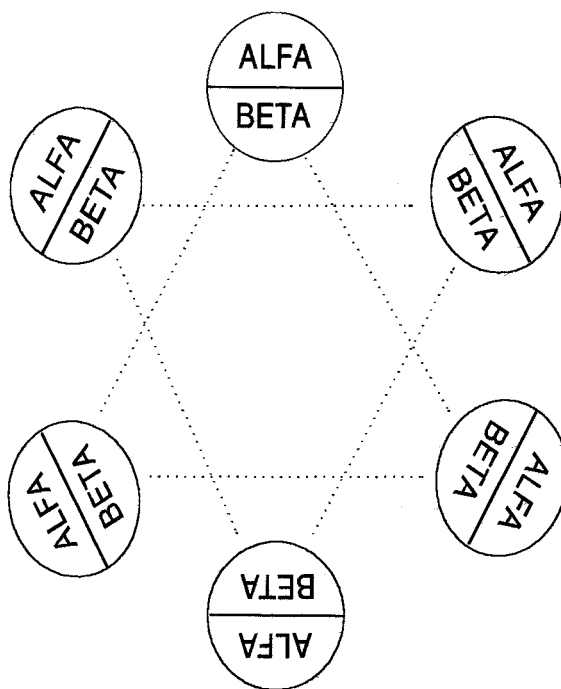


Figura 19. Representación esquemática de la estructura cuaternaria de las proteínas tipo 11S de las leguminosas. Tomado de Plietz *et al.*, 1980.

Venkataraman, 1980). Las albúminas representaron el 16.0% de las proteínas totales. Se considera que las albúminas son mayoritariamente enzimas e inhibidores de proteasas, aunque algunas podrían tener papel de reserva (Guéguen *et al.*, 1996). El vicilín o proteína 7S del garbanzo fue la fracción minoritaria con un porcentaje de 1.9%. Las proteínas 7S son proteínas glicosiladas, muy heterogéneas, triméricas, sin puentes disulfuro, y con un peso molecular de 150-180 KDa (Guéguen *et al.*, 1996). El vicilín del garbanzo está poco estudiado aunque parece ser que posee subunidades de 37 y 73 Kda (Vairinhos y Murray, 1982b).

Para comprobar la eficacia de la separación, se realizó una PAGE-SDS de cada una de estas fracciones (Figura 20).

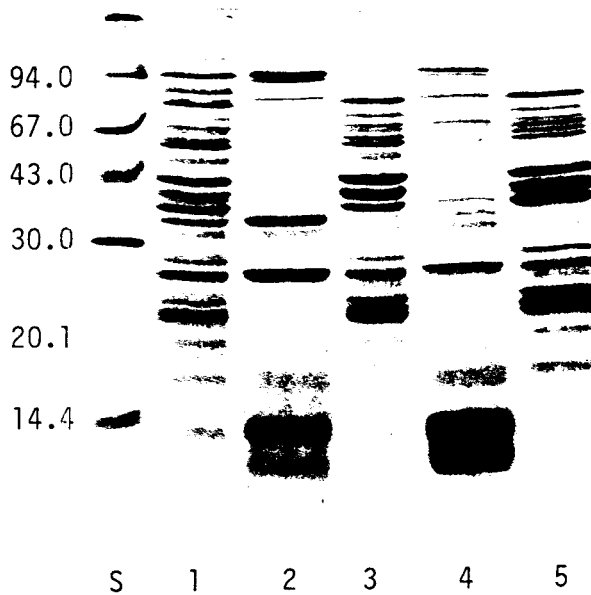


Figura 20. SDS-PAGE de las proteínas totales extraídas del garbanzo (calle 1), la fracción de albúminas (calle 2), la fracción de globulinas (calle 3), la fracción de vicilín (calle 4) y la fracción de legumín (calle 5). El kit de proteínas estandar con sus pesos moleculares en KDa aparece en la calle S.

Las proteínas de la semilla del garbanzo (calle 1) aparecieron caracterizadas por una serie de bandas de 46.5-39.8 KDa y 25.3-24.3 KDa que corresponden a los pesos moleculares de las subunidades α y β , respectivamente, de la proteína 11S del garbanzo. Estas bandas se intensificaron en las fracciones de globulinas y legumín (calles 3 y 5, respectivamente), lo cual indica un enriquecimiento en esta proteína. Por otro lado, en las proteínas totales de la semilla, también pudo observarse una serie de bandas de pesos moleculares de 82.3, 37.7, 28.3, 16.6, 12.5 y 10.1 KDa que se reforzaron en las fracciones de albúminas (calle 2) y vicilín (calle 4). Las albúminas de 28.3 y 16.6 KDa aparecieron contaminando a la fracción de legumín aunque fue la fracción de vicilín la que presentó las principales contaminaciones. De hecho, los perfiles en SDS-PAGE de albúminas y vicilín fueron prácticamente idénticos, diferenciándose sólo en la intensidad relativa de algunas de sus bandas. Además, en la fracción vicilín no aparecieron como bandas mayoritarias las subunidades de 37 y 73 KDa descritas como integrantes de esta proteína (Vairinhos y Murray, 1982b).

Para confirmar los datos obtenidos mediante electroforesis, se estudiaron las fracciones mediante filtración en gel (Figura 21). La fracción de albúminas estaba compuesta principalmente por proteínas de bajo peso molecular coincidiendo con los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE. El perfil de la fracción de vicilín volvió a coincidir claramente con el de las albúminas (observe la similitud entre los pesos moleculares de los picos A y B de las albuminas frente a los B y C del vicilín), y no apareció ningún pico con un peso molecular próximo al descrito para el vicilín (entre 150 y 180 Kda) (Guéguen *et al.*, 1996), confirmando que esta fracción no está compuesta por la proteína vicilín sino por restos de albúminas que se insolubilizaron en la primera diálisis del método pero permanecieron solubles en la segunda. Esto también explicaría por qué el porcentaje de vicilín obtenido es tan bajo (menos del 2% del nitrógeno total de la semilla) comparado con el obtenido en otros trabajos (Singh *et al.*, 1988).

Estos datos sugieren que aunque este método separa eficazmente las albúminas de las globulinas, no es capaz de fraccionar a éstas entre sí, y lo que en realidad ocurre en la segunda

Clasificación de las proteínas del garbanzo

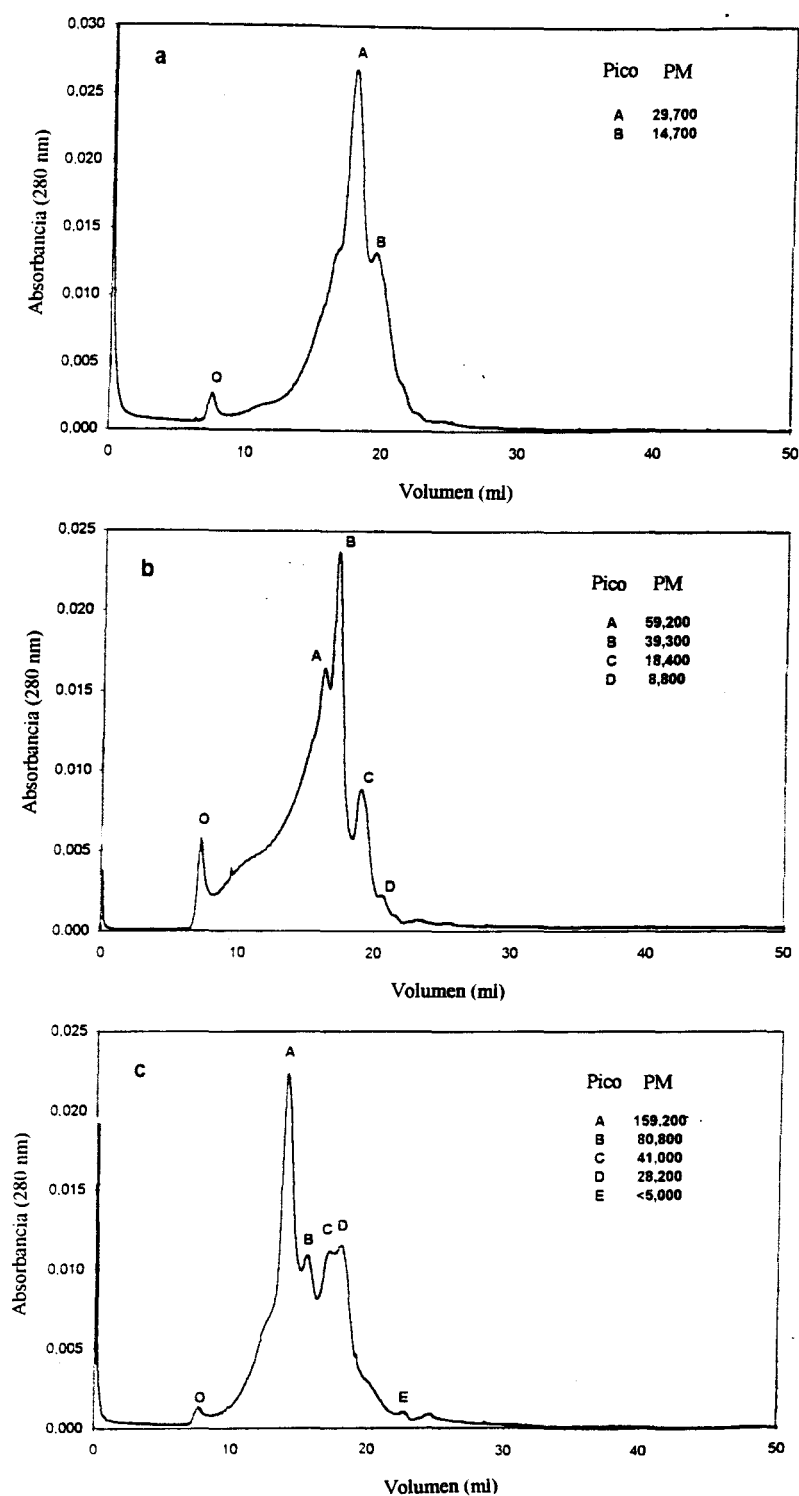


Figura 21. Cromatografía de filtración en gel (Superose 6) de las fracciones de albúminas (a), vicilín (b) y legumín (c) separadas mediante el fraccionamiento de Singh *et al.* (1988).

diálisis, no es más que una nueva purificación entre globulinas y albúminas. Esto podría deberse a que ambas diálisis se realizan frente al mismo tampón. Aunque en la segunda diálisis se parte de una solución en la que se ha aumentado, respecto a la primera, la fuerza iónica con 0.2 M de NaCl, parece ser que esto no es suficiente, y que al final de la diálisis tanto el vicilín como el legumín han precipitado, quedando en el sobrenadante las albúminas que no se separaron en la primera diálisis.

En cualquier caso el método de Singh *et al.* (1988) es adecuado para la obtención de albúminas y de una fracción enriquecida en legumín, ya que relativamente en poco tiempo permite disponer de varias decenas de gramos de material. Estas fracciones servirán para la caracterización de los aislados proteicos así como para la purificación de la proteína legumín, que se utilizará posteriormente en los ensayos de interacción lípido-proteína.

IV.2. Purificación de la proteína legumín.

La fracción legumín obtenida mediante la separación de Singh *et al.* (1988) se purificó mediante la aplicación sucesiva de: (i) cromatografía de intercambio aniónico y, (ii) cromatografía de filtración en gel.

Mediante intercambio aniónico en DEAE Sepharose CL-6B, la fracción legumín se separó en 5 fracciones (Figura 22), que se nombraron como I (proteínas no retenidas por la columna), II, III, IV y V. Los porcentajes de cada una de estas fracciones, medidos como cantidad de proteína por el método de Bradford, aparecen en la Tabla 4. Las fracciones I y II constituyeron más del 80% de las proteínas separadas por intercambio aniónico. Las proteínas no retenidas de pesos moleculares de 82.3, 37.7, 28.3, 16.6 y 12.5 KDa coincidieron con las albúminas separadas por el método de Singh *et al.* (1988) (Figura 23).

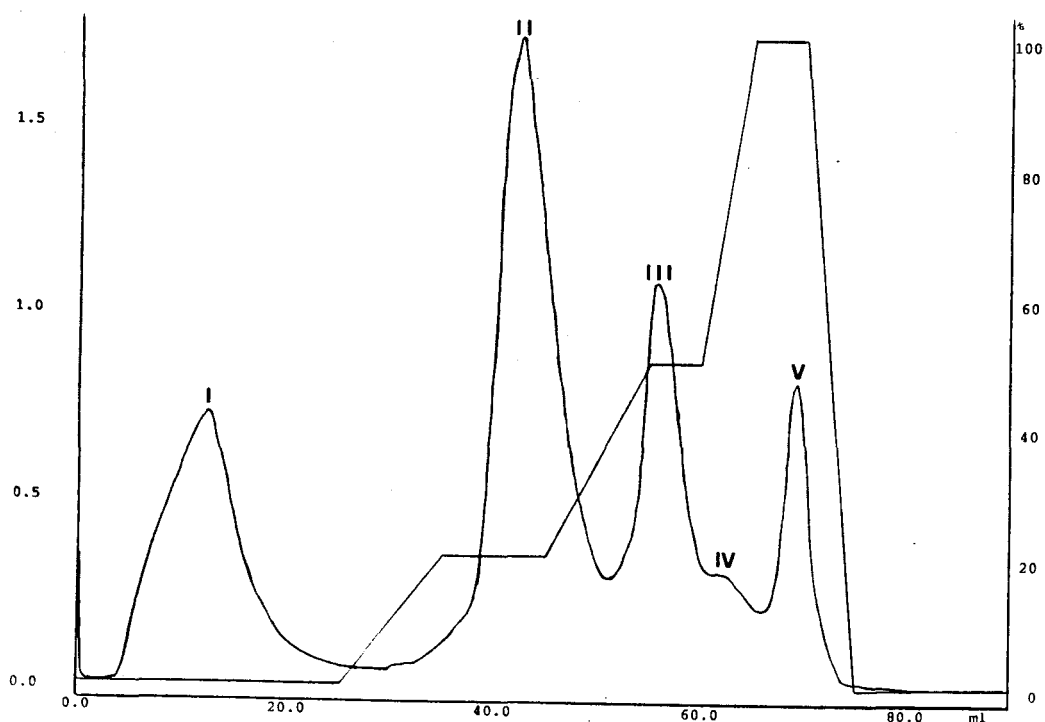


Figura 22. Purificación de la fracción legumín (Singh *et al.*, 1988) mediante cromatografía de intercambio aniónico (DEAE Sepharose CL-6B). Proteínas no retenidas en la columna (Fracción I).

Tabla 4. Balance obtenido en la purificación de la fracción legumín mediante intercambio aniónico (DEAE Sepharose CL-6B). Los datos, medidos según el método de Bradford, expresan los porcentajes de proteína respecto al total recuperado de la columna.

Fracción	Porcentaje de proteína
I ^a	43.8 ± 1.1 ^b
II	40.3 ± 2.4
III	14.3 ± 0.3
IV	1.0 ± 0.1
V	0.5 ± 0.0

a: Proteínas no retenidas en la columna.

b: Los datos son la media ± desviación estandar de 2 determinaciones.

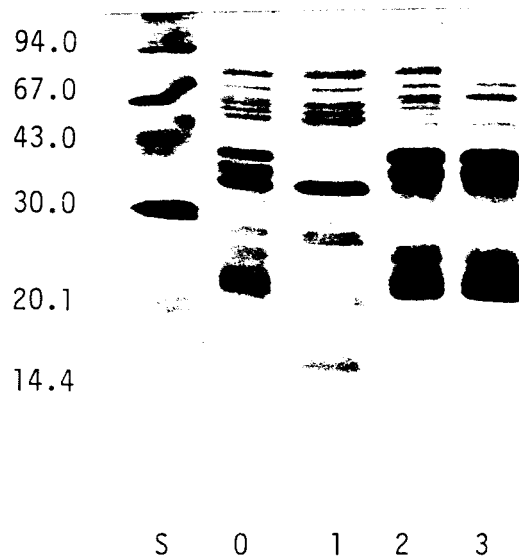


Figura 23. SDS-PAGE de la fracción legumín (calle 0), Fracción I (calle 1), Fracción II (calle 2) y Fracción III (calle 3). El kit de proteínas estandar, con sus pesos moleculares en KDa aparece en la calle S.

El perfil en SDS-PAGE de las fracciones II y III (las fracciones IV y V no se consideraron por ser muy minoritarias) fue prácticamente idéntico. Esta similitud podría deberse a que estos picos correspondan a distintos grados de polimerización del legumín, ya que la agregación de las proteínas 11S es un fenómeno frecuente (Wolf y Nelsen, 1996).

La Fracción II, que fue la fracción retenida mayoritaria, se purificó mediante filtración en gel en Sephacryl S-300, obteniéndose el siguiente perfil (Figura 24). Mediante SDS-PAGE (Figura 25), se vio que las fracciones más ricas en legumín correspondían a los volúmenes de elución de la columna entre 152 y 177 ml (fracciones 32-36, ambas inclusive), siendo estas fracciones recuperadas. El balance obtenido, por el método de Bradford, en la purificación de la Fracción II mediante filtración en gel aparece en la Tabla 5.

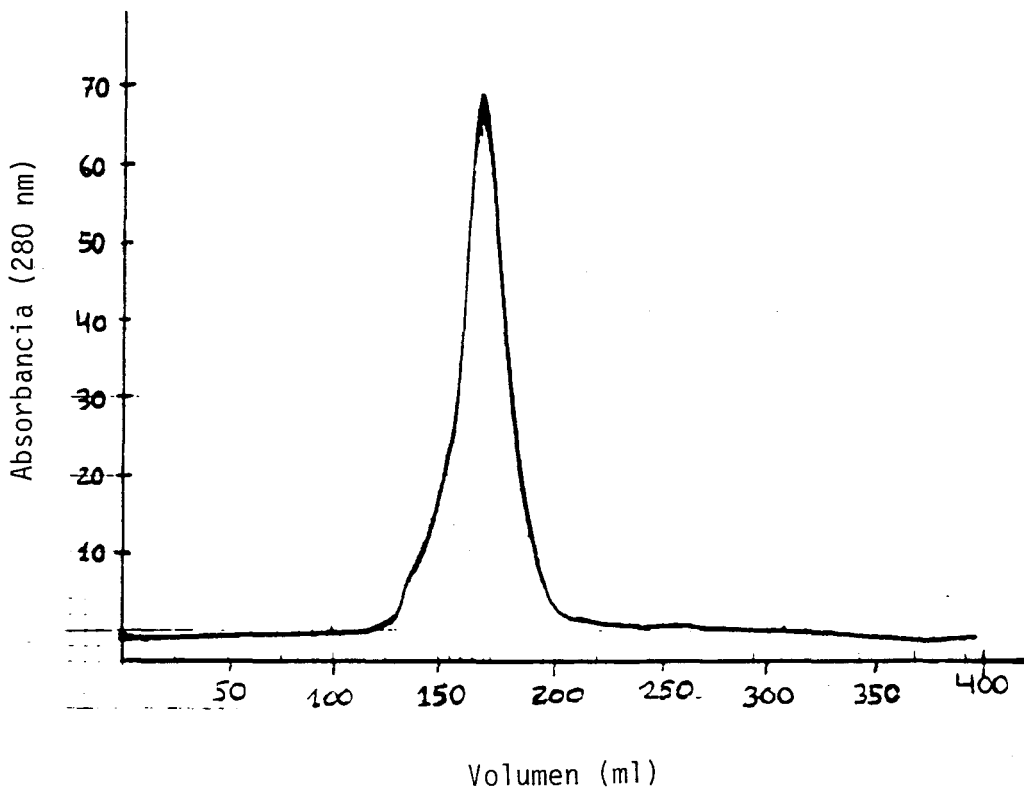


Figura 24. Purificación de la Fracción II mediante cromatografía de filtración en gel (Sephacryl S-300).

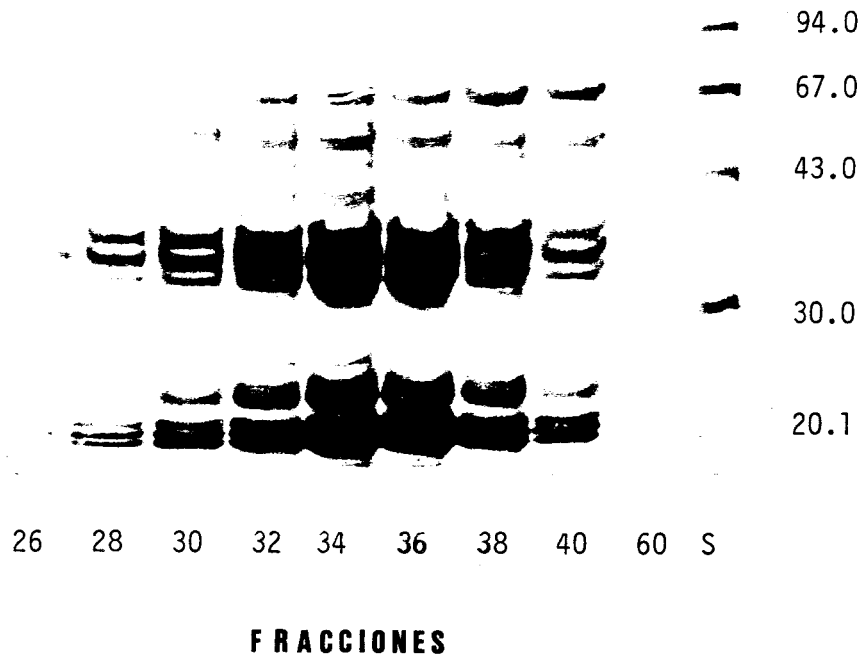


Figura 25. SDS-PAGE de las fracciones separadas mediante filtración en gel (Sephacryl S-300). El kit de proteínas estándar con sus pesos moleculares en kDa aparece en la calle S.

Tabla 5. Balance obtenido en la purificación de la Fracción II mediante filtración en gel (Sephacryl S-300). Los datos, obtenidos por el método de Bradford, expresan los porcentajes de proteína respecto al total recuperado de la columna.

Fracción	Porcentaje de proteína
26-31	11.5 ± 0.1 ^a
32-36	50.3 ± 3.7
37-46	38.2 ± 0.4

a: Los datos son la media ± desviación estándar de 2 determinaciones.

El grado de pureza de la proteína legumín (Figura 26) después de esta última purificación se consideró adecuado para el estudio de las interacciones proteína-lípidos oxidados.

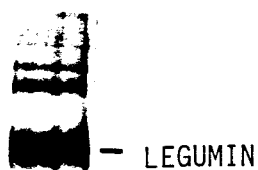


Figura 26. PAGE de la proteína legumín purificada sucesivamente mediante el fraccionamiento de Singh *et al.* (1988), intercambio aniónico (DEAE Sepharose CL 6B) y filtración en gel (Sephacryl S-300).

IV.3. Obtención y estudio de los aislados proteicos del garbanzo.

Frente a otros procedimientos, como son la separación de las proteínas mediante membranas de ultrafiltración o la precipitación de las proteínas por dilución con agua a partir de extractos salinos, la extracción de las harinas o concentrados proteicos en medio alcalino, y la posterior precipitación en su pI de las proteínas solubilizadas, es la forma más habitual y económica de obtener aislados proteicos. Esto es debido al bajo coste de los reactivos que se utilizan, la simplicidad de los aparatos requeridos y los buenos rendimientos que se consiguen.

Se prepararon 2 tipos de aislados, extrayendo las proteínas con hidróxido sódico (aislado A), y con hidróxido sódico + sulfito sódico (aislado B), según está descrito en el apartado III.3.14. Con el primero de estos aislados se pretendía obtener el mayor rendimiento posible con el menor coste de reactivos, para lo cual se extrajo la harina del garbanzo con una solución de hidróxido sódico a un pH aproximado de 12, que es adecuado para extraer la mayor parte de las proteínas del garbanzo (Ulloa *et al.*, 1988). Uno de los problemas que presenta la elaboración de aislados proteicos a partir de materias primas vegetales es que durante la extracción de las proteínas a pH alcalino se produce el oscurecimiento de las mismas debido a la oxidación y posterior polimerización de los polifenoles presentes en la harina. Este oscurecimiento limita su uso en la alimentación y además afecta a la biodisponibilidad de algunos aminoácidos, principalmente de la lisina (Gassmann, 1983). Para evitar esto, los polifenoles se suelen extraer mediante mezclas hidroalcohólicas, pero esta extracción conlleva desnaturalizar parte de las proteínas. Una alternativa a la eliminación de los polifenoles, es evitar su oxidación utilizando sulfito sódico en el medio de extracción (Gheyasuddin *et al.*, 1970). Los lavados con etanol 96% y acetona, usados en la preparación del aislado B, ayudan a disminuir los componentes no proteicos de los aislados y también mejoran el blanqueamiento de las proteínas.

El punto isoeléctrico (pI) se determinó mediante el procedimiento descrito en el apartado III.3.13, siendo la solubilidad de las proteínas del garbanzo mínima a pH 4.3 (Figura 27).

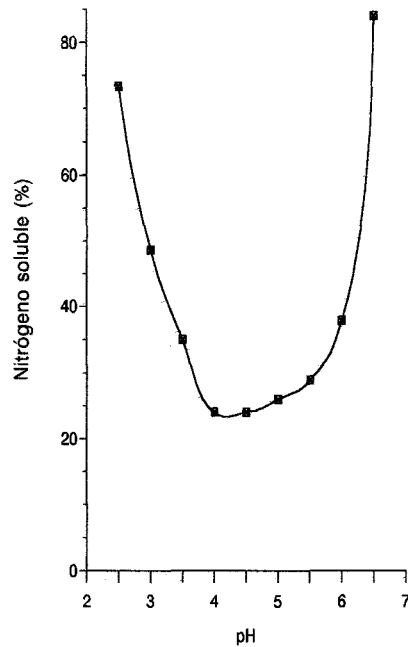


Figura 27. Curva de solubilidad de las proteínas del garbanzo a distintos pH. Los puntos de la gráfica representan el porcentaje de proteína soluble respecto al total de proteínas extraídas con NaOH 0.2%.

IV.3.1. Rendimiento del proceso.

Los balances de nitrógeno obtenidos en la preparación de ambos aislados fueron bastante parecidos entre sí (Tabla 6). No obstante, aunque en la preparación del aislado A se usó un pH más alcalino que en el B para extraer las proteínas, fue este último el que obtuvo una mayor solubilización de las mismas. En ambos aislados se extrajo más del 80% del nitrógeno de la harina. En la precipitación isoelectrica de las proteínas se perdió entre un 15.0% y un 25.0% del nitrógeno, que está constituido por las proteínas solubles a pH 4.3. Berot y Davin (1996) consideran que estas proteínas podrían ser, al menos en su mayoría, albúminas. La recuperación

del nitrógeno total presente en la harina de garbanzo fue de un 65.9% para el aislado A y del 62.1% para el B.

Tabla 6. Distribución del nitrógeno durante la preparación de los aislados A y B a partir de la harina de garbanzo. Los datos están expresados en porcentaje respecto al contenido total de nitrógeno de la harina de garbanzo.

	N extraído	N insoluble en el pI	N soluble en el pI
Aislado A			
1ª Extracción	62.8 ± 2.8 ^a	51.7 ± 2.3	11.1 ± 0.5
2ª Extracción	14.1 ± 0.4	11.2 ± 0.3	2.9 ± 0.1
3ª Extracción	4.0 ± 0.4	3.0 ± 0.3	1.0 ± 0.0
TOTAL	80.9 ± 3.5	65.9 ± 2.9	15.0 ± 0.7
Nitrógeno no extraído	19.1 ± 3.5	--	--
Aislado B			
1ª Extracción	71.3 ± 1.3	50.3 ± 0.6	21.0 ± 0.7
2ª Extracción	11.2 ± 0.6	8.4 ± 0.1	2.8 ± 0.4
3ª Extracción	4.6 ± 0.1	3.4 ± 0.3	1.2 ± 0.2
TOTAL	87.1 ± 1.9	62.1 ± 1.1	25.0 ± 1.4
Nitrógeno no extraído	12.9 ± 1.9	--	--

a: Los datos son la media ± desviación estandar de 2 experimentos independientes.

IV.3.2. Composición química de los aislados.

Como consecuencia de los lavados con etanol y acetona, el aislado B presentó un menor contenido en fibra, lípidos asociados, sólidos disueltos, azúcares solubles e hidratos de carbono, y por tanto, su contenido en proteína (83.4%) fue mayor que en el aislado A (74.2%) (Tabla 7).

Conviene destacar la importante disminución de los lípidos asociados del aislado B (1.0%) frente al A (3.4%) lo cual debería repercutir positivamente en su estabilidad. La diferente preparación también tuvo influencia en el color de ambos aislados ya que el B, a diferencia del A, fue prácticamente blanco (Figura 28). El color del aislado A tampoco fue oscuro, probablemente debido al bajo contenido en polifenoles de la harina ($< 0.1\%$). El que un aislado tenga un color claro es siempre un aspecto positivo ya que así se evita que interfiera en el color natural del alimento al que se añade.

Tabla 7. Composición química de la harina de garbanzo y los aislados proteicos A y B. Los datos están expresados como gramos por cada 100 g de muestra.

	Harina de garbanzo	Aislado A	Aislado B
Humedad	8.1 ± 0.1^a	3.3 ± 0.2	5.5 ± 0.1
Cenizas	3.4 ± 0.1	2.8 ± 0.3	4.1 ± 0.2
Fibra	17.3 ± 2.0	3.7 ± 0.3	3.0 ± 0.1
Proteína ^b	22.7 ± 1.7	74.2 ± 2.1	83.4 ± 2.7
Lípidos asociados	1.4 ± 0.3	3.4 ± 0.4	1.0 ± 0.2
Polifenoles	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Sólidos disueltos	6.6 ± 1.6	11.7 ± 1.9	1.5 ± 0.3
Azúcares solubles	2.6 ± 0.3	1.3 ± 0.2	0.2 ± 0.0
Hidratos de carbono ^c	47.1 ± 5.5	12.6 ± 1.5	3.0 ± 0.3

a: Los datos son la media \pm desviación estandar de al menos 3 determinaciones.

b: Nitrógeno $\times 6.25$.

c: Calculado como $100 - \text{humedad} - \text{cenizas} - \text{fibra} - \text{proteína} - \text{lípidos asociados}$.

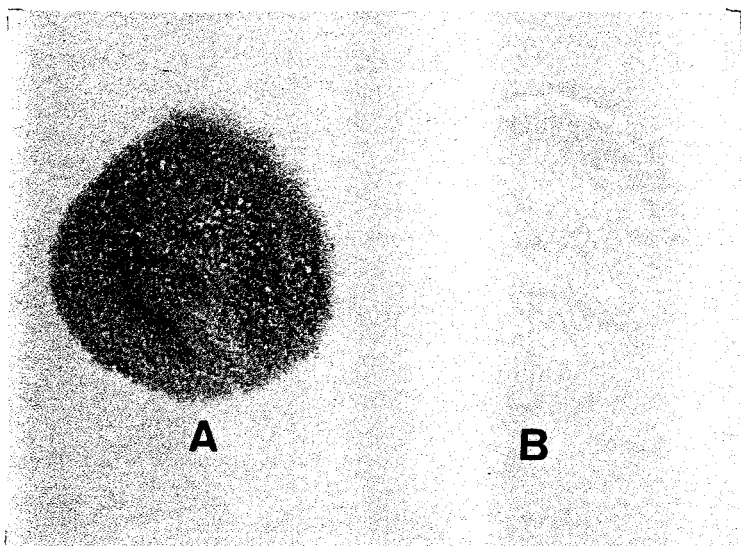


Figura 28. Aislados proteicos A y B.

IV.3.3. Propiedades funcionales básicas de los aislados.

Mientras que el aislado A mostró una mayor absorción de agua y grasa que el B, éste fue más soluble y presentó mejores propiedades emulsionantes (Tabla 8). La correlación negativa entre la solubilidad de las proteínas en medios con NaCl y su absorción de agua ha sido observada por Wagner y Añón (1990). La solubilidad del aislado A fue del 26.6%, casi la mitad que la del aislado B (46.3%), lo cual *a priori* parece lógico si tenemos en cuenta que el pH utilizado para la extracción de las proteínas fue de 12 en el caso del aislado A, bastante más alto que el usado para el B (pH 10.5). Estas condiciones de pH más drásticas deben perjudicar en mayor medida la estructura nativa de la proteína, desnaturalizándolas y dificultando su posterior solubilidad. Además, la mayor presencia de lípidos asociados en el aislado A respecto al B, debe, en principio, disminuir también su solubilidad (Boatright y Hettiarachchy, 1995). La capacidad emulsionante, que aumenta en gran medida con la solubilidad de las proteínas (Li-Chan *et al.*, 1984), fue peor en el aislado A (481 g/100 g muestra) que en el B (769 g/100 g muestra).

Tabla 8. Propiedades funcionales básicas de la harina de garbanzo y de los aislados proteicos A y B.

	Harina de garbanzo	Aislado A	Aislado B
Solubilidad ^b	31.8 ± 1.1 ^a	26.6 ± 0.9	46.3 ± 3.2
Absorción de agua ^c	178.8 ± 2.4	343.7 ± 30.1	199.5 ± 4.9
Absorción de grasa ^d	135.8 ± 6.1	409.4 ± 24.9	125.7 ± 11.2
Capacidad de emulsión ^e	947.0 ± 7.0	481.0 ± 57.0	769.0 ± 22.0

a: Los datos son la media ± desviación estandar de 3 determinaciones.

b: Porcentaje de nitrógeno soluble (ó NSI) a pH 7.0 y 0.1 M NaCl.

c: Gramos de agua absorbida por cada 100 g de muestra.

d: Gramos de grasa absorbida por cada 100 g de muestra.

e: Gramos de grasa emulsionada por cada 100 g de muestra.

En cambio, la absorción de agua y grasa fueron muy superiores en el aislado A (343.7 g/100 g muestra) respecto al B (199.5 g/100 g muestra). Esta diferencia podría deberse también a la mayor desnaturalización de las proteínas del aislado A ya que tales proteínas tienden a formar matrices proteicas, estabilizadas por fuerzas hidrofóbicas, que parecen retener más agua que las proteínas nativas (Wagner y Añon, 1990). La absorción de agua del aislado A fue similar a los valores obtenidos para los aislados proteicos de soja que generalmente absorben 3-4 veces su propio peso (Waggle *et al.*, 1989). La superior absorción de grasa del aislado A respecto al B podría ser atribuida a la exposición de aminoácidos apolares como consecuencia de la desnaturalización proteica (Zayas, 1997). La absorción de grasa del aislado A fue más del doble que la obtenida para otros aislados proteicos de garbanzo similares (Paredes López *et al.*, 1991), lo cual lo hace muy adecuado para ser utilizado como ingrediente de alimentos en los que la retención de grasa es importante, tales como productos cárnicos y lácteos.

IV.3.4. Caracterización de las proteínas de los aislados.

Durante la obtención de los aislados proteicos, se perdía en la precipitación isoelectrónica entre un 15 y un 25% de las proteínas de la harina de garbanzo (presumiblemente albúminas), que quedaban solubles en el suero. El análisis de estas proteínas mediante SDS-PAGE (Figura 29, calles 3 y 6) mostró como coinciden en gran medida con las albúminas separadas por el método de Singh *et al.* (1988), identificándose las de peso molecular de 82.3, 37.7, 28.3, 12.5 y 10.1 KDa. Así mismo, las unidades α y β de la proteína legumin se intensifican, respecto al total de proteínas extraídas (calles 1 y 4), en las proteínas precipitadas en el pI (calles 2 y 5).

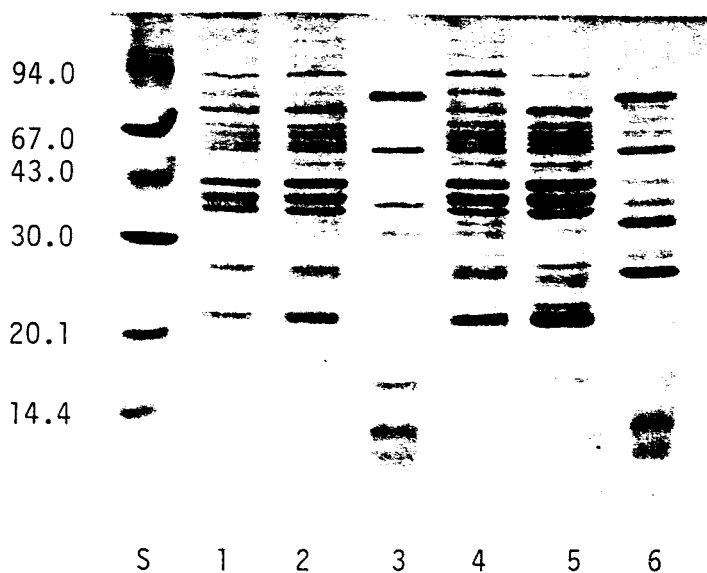


Figura 29. SDS-PAGE de las proteínas extraídas (calle 1), extraídas y precipitadas en el pI (calle 2) y extraídas y solubles en el pI (calle 3) en la preparación del aislado A. SDS-PAGE de las proteínas extraídas (calle 4), extraídas y precipitadas en el pI (calle 5) y extraídas y solubles en el pI (calle 6) en la preparación del aislado B. El kit de proteínas estandar con sus pesos moleculares en KDa aparece en la calle S.

Estos resultados confirman que las proteínas extraídas en medio alcalino que se pierden durante la precipitación ácida son albúminas, enriqueciéndose los aislados en la proteína legumín. Al representar el legumín el 64.3% de la proteínas totales del garbanzo, su punto isoeléctrico coincide con el utilizado para preparar los aislados, incrementándose su contenido en los aislados respecto a la harina de partida.

A pesar de la gran similitud en SDS-PAGE de las proteínas de los aislados A y B, sus perfiles en cromatografía de filtración en gel fueron muy diferentes (Figura 30). El aislado A se caracterizó por un pico mayoritario (pico B) de 61.1KDa y otro menor (pico A) de 205.2 KDa que se corresponde con el legumín. También se observó un gran pico (pico O) probablemente constituido por proteínas polimerizadas ya que corresponde a un peso molecular superior a los 3000 KDa. La agregación de las proteínas 11S es un hecho bastante común, que se ve favorecido cuando las proteínas se congelan o liofilizan (Wolf y Nelsen, 1996), etapas por las que pasa el aislado A durante su elaboración. En el aislado B, en cambio, como era de esperar, el legumín fue el pico mayoritario (pico A), coincidiendo su perfil con el de la fracción de legumín separada mediante el fraccionamiento de Singh *et al.* (1988) (Figura 21). Puede apreciarse también como el pico de legumín aumenta su porcentaje en el aislado B respecto a la harina de garbanzo. Estas diferencias entre ambos aislados parece que de nuevo son atribuibles a los valores de pH utilizados en la extracción de las proteínas. El cromatograma del aislado A muestra, respecto al B, una disminución del legumín y la aparición de una serie de proteínas de menor peso molecular, cuyo máximo de 61.1 KDa, coincide con el peso molecular de los monómeros $\alpha\beta$ (alrededor de 60 KDa) del legumín. Esto indica una disociación del legumín durante su extracción, como ha sido demostrado que ocurre en las proteínas 11S cuando se les somete a pH superior a 11 (Guéguen *et al.*, 1988). La separación del legumín en sus monómeros conllevaría la exposición de las cadenas hidrófobas β , que en la proteína original están ocultas al medio, lo cual implicaría importantes cambios en las propiedades funcionales (Guéguen, 1989). Esto explicaría las diferencias tan acusadas entre las propiedades funcionales de ambos aislados.

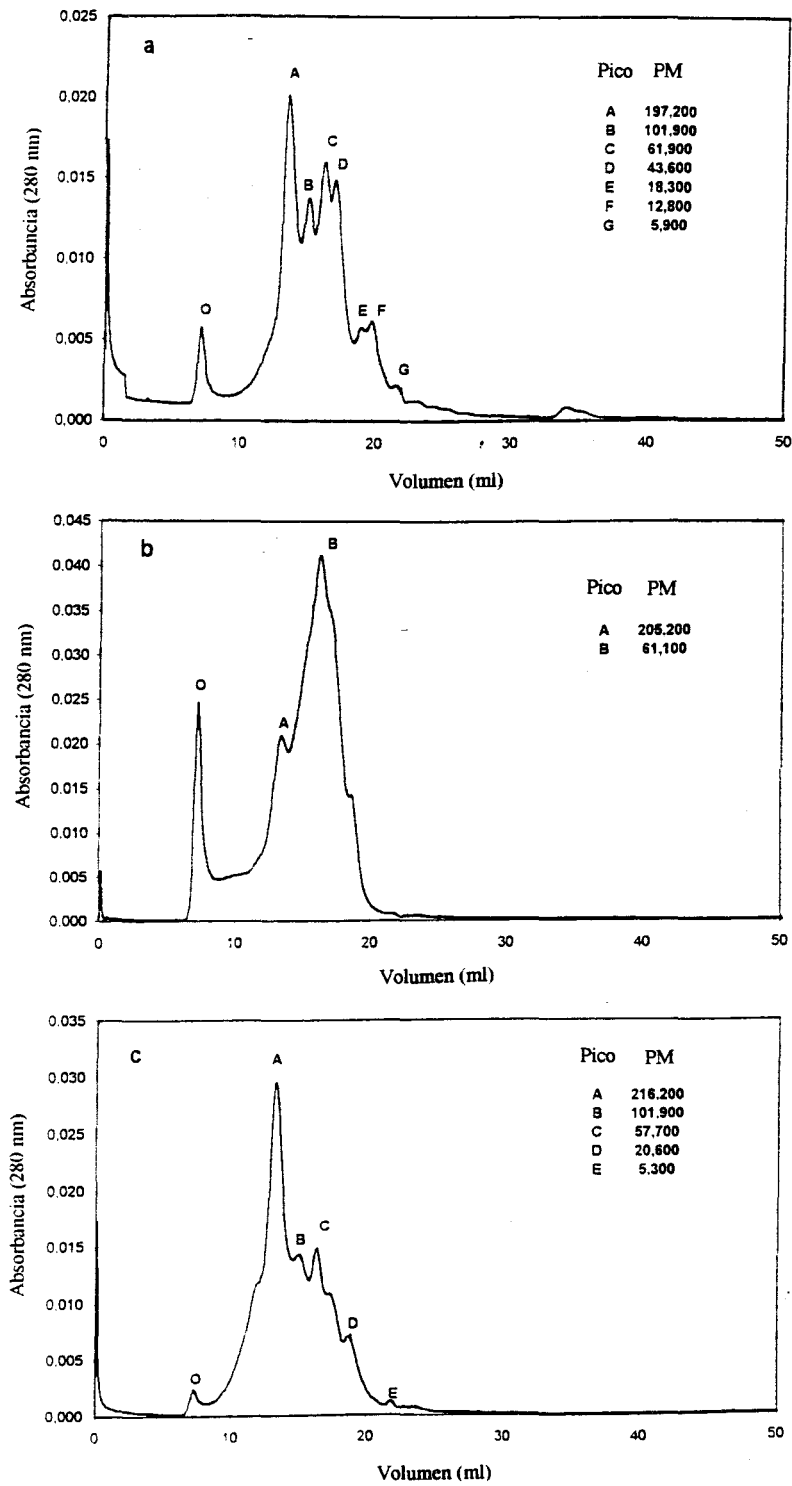


Figura 30. Cromatografía de filtración en gel (Superose 6) de las proteínas de: la harina de garbanzo (a), el aislado A (b) y el aislado B (c).

La composición en aminoácidos de las proteínas precipitadas y no precipitadas en la preparación de los aislados A y B, así como la de las albúminas y globulinas separadas mediante el fraccionamiento de Singh *et al.* (1988), se muestran en la Tabla 9. Respecto a la harina de garbanzo, las albúminas fueron especialmente ricas en treonina, aminoácidos azufrados y lisina con 7.3, 7.7 y 10.6 g / 100 g de proteína, respectivamente, y más pobres en arginina, valina, isoleucina, leucina y fenilalanina (9.1, 4.5, 4.4, 6.8 y 4.5 g / 100 g de proteína, respectivamente); en cambio el legumín mostró una composición muy similar a la de la harina con mayores cantidades de aspártico / asparagina, glutámico / glutamina, arginina y valina (15.0, 21.9, 13.4 y 6.2 g / 100 g de proteína, respectivamente) y menores de treonina, tirosina, azufrados y lisina (3.6, 2.7, 3.0 y 7.4 g / 100 g de proteína, respectivamente). Es decir, en general, las albúminas fueron ricas en los aminoácidos en que el legumín fue pobre, y *viceversa*. Las diferencias entre legumín y la harina fueron menores que entre ésta y las albúminas ya que el legumín es la proteína mayoritaria de la semilla del garbanzo. Como es lógico, la composición del legumín se asemejó a la de los aislados mientras que la de las albúminas fue parecida a la de los sueros. A pesar de que la pérdida de las albúminas durante la preparación de los aislados significa una disminución en el contenido de ciertos aminoácidos esenciales, principalmente de los azufrados y la lisina, tanto el aislado proteico A como el B cumplieron con todos los requerimientos de la FAO (1985) para los aminoácidos esenciales.

IV.3.5. Digestibilidad proteica *in vitro* de los aislados.

Las enzimas utilizadas para la estimación del valor nutricional de las proteínas imitan el proceso real de la digestión gastro-intestinal y permiten evaluar el papel de los distintos factores que van a influir en la disponibilidad final de los aminoácidos: la estructura proteica, la presencia de inhibidores de los enzimas o de complejos poco digestibles y la influencia de los procesos tecnológicos aplicados (Fevrier y Viroben, 1996). Los datos de la digestibilidad enzimática de los aislados mostraron valores muy altos (95.6 - 96.1%), mayores incluso al de una proteína

Tabla 9. Composición aminoacídica de las proteínas precipitadas en la preparación de los aislados A y B, de las no precipitadas (sueros A y B), y de las albúminas y legumín separadas mediante el fraccionamiento de Singh *et al.* (1988). Los datos están expresados en gramos de aminoácido por cada 100 g de proteína.

	FAO (1985)	Harina de garbanzo	Aislado A	Suero A	Aislado B	Suero B	Albúminas	Legumín
Asp + Asn		13.7 ± 0.3 ^a	14.2 ± 0.4	13.8 ± 0.7	13.7 ± 0.3	15.3 ± 0.4	13.6 ± 0.0	15.0 ± 0.3
Glu + Gln		19.5 ± 0.2	19.3 ± 0.2	23.1 ± 0.1	19.1 ± 0.2	21.5 ± 0.5	17.8 ± 0.1	21.9 ± 0.1
Ser		6.7 ± 0.1	6.8 ± 0.1	7.3 ± 0.2	7.1 ± 0.1	6.9 ± 0.4	6.5 ± 0.0	6.6 ± 0.1
His	1.9	3.3 ± 0.0	3.2 ± 0.1	3.9 ± 0.0	3.3 ± 0.0	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.0	3.3 ± 0.0
Gly		4.8 ± 0.1	4.5 ± 0.0	5.8 ± 0.3	4.7 ± 0.0	6.3 ± 0.1	5.6 ± 0.1	4.5 ± 0.1
Thr	3.4	4.7 ± 0.1	4.4 ± 0.1	6.0 ± 0.5	4.3 ± 0.1	7.1 ± 0.1	7.3 ± 0.0	3.6 ± 0.1
Arg		12.3 ± 0.1	11.2 ± 0.1	9.3 ± 0.3	11.8 ± 0.1	8.4 ± 0.1	9.1 ± 0.1	13.4 ± 0.2
Ala		5.4 ± 0.0	5.2 ± 0.1	4.5 ± 0.2	5.3 ± 0.1	5.2 ± 0.2	5.3 ± 0.0	5.1 ± 0.1
Tyr		4.0 ± 0.0	4.1 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.8 ± 0.2	4.1 ± 0.7	4.8 ± 0.0	2.7 ± 0.1
Val	3.5	5.7 ± 0.1	5.9 ± 0.1	4.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	3.8 ± 0.1	4.5 ± 0.1	6.2 ± 0.1
Met	2.5 ^b	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.3	2.4 ± 0.6	1.6 ± 0.1	2.2 ± 0.6	3.3 ± 0.1	1.5 ± 0.3
Cys		1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	5.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	4.6 ± 0.6	4.4 ± 0.0	1.5 ± 0.1
Ile	2.8	6.0 ± 0.1	6.2 ± 0.1	4.0 ± 0.1	6.3 ± 0.0	3.9 ± 0.3	4.4 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Leu	6.6	10.0 ± 0.1	10.4 ± 0.1	7.9 ± 0.2	10.7 ± 0.1	6.3 ± 0.4	6.8 ± 0.0	9.7 ± 0.1
Phe	6.3 ^c	7.9 ± 0.1	8.2 ± 0.1	4.6 ± 0.1	8.5 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.5 ± 0.0	7.6 ± 0.1
Lys	5.8	8.5 ± 0.1	7.7 ± 0.1	11.0 ± 0.1	7.4 ± 0.1	11.3 ± 0.2	10.6 ± 0.0	7.4 ± 0.2

a: Los datos son la media ± desviación estándar de 2 determinaciones.

b: Metionina + cisteína.

c: Fenilalanina + tirosina.

de calidad como es la BSA, que se usó como control, y muy superiores al valor obtenido, 76.2%, para la harina de garbanzo (Tabla 10).

Tabla 10. Digestibilidad proteica *in vitro* de la harina de garbanzo, los aislados A y B y las fracciones de albúminas y legumín. Los datos están expresados en porcentaje de proteína digerible.

	Digestibilidad proteica <i>in vitro</i>
BSA	92.5 ± 0.1 ^a
Harina de garbanzo	76.2 ± 1.9
Aislado A	95.6 ± 1.5
Aislado B	96.1 ± 2.7
Fracción de albúminas	73.0 ± 1.6
Fracción de legumín	82.9 ± 0.1

a: Los datos son la media ± desviación estandar de al menos 3 determinaciones.

Las causas de este incremento respecto a la harina pueden ser varias. Por un lado, se ha comprobado en aislados de soja que la obtención de los mismos conduce a una reducción de hasta un 70% en el contenido de inhibidor de la tripsina (Struthers *et al.* 1983), que es una proteína considerada como albúmina (Créviu *et al.*, 1996). El efecto beneficioso de la eliminación de las albúminas de garbanzo parece claro, dada su baja digestibilidad (73.0%), pero esta causa no parece ser suficiente para explicar la alta digestibilidad de los aislados, ya que la fracción de legumín, a pesar de su parecida composición proteica, mostró una digestibilidad muy inferior (82.9%) a la de los aislados. Esta diferencia podría deberse a la desnaturalización del legumín durante la preparación de los aislados, hecho que favorece la digestibilidad proteica (Lynch *et al.*, 1977). Sin embargo, la digestibilidad del aislado A debería ser superior a la del B, debido a la mayor disociación del legumín por efecto del pH. Esto no se reflejó en las digestibilidad de ambos aislados, que fue prácticamente igual. Una posible explicación es que también hay otros factores

que podrían intervenir favoreciendo la digestibilidad del aislado B respecto al A, como son una mejor solubilidad y un menor contenido de impurezas no proteicas. El menor grado de polimerización proteica del aislado B, según los perfiles de filtración en gel (ver Figura 30), es también una ventaja puesto que los agregados proteicos de alto peso molecular son resistentes a la hidrólisis (Genovese y Lajolo, 1996).

Resumiendo, podemos afirmar que las principales consecuencias derivadas de la utilización de uno u otro método para la obtención de los aislados proteicos son el distinto grado de pureza proteica y la disociación o no de la proteína legumín. Estas diferencias se reflejan principalmente en las propiedades funcionales, donde los valores obtenidos para uno y otro tipo de aislado son completamente distintos. Otros aspectos, igualmente importantes, como son el rendimiento en la obtención, la composición aminoacídica o la digestibilidad proteica no se vieron afectados por el procedimiento de preparación de los aislados.

IV.4. Estudio de los lípidos asociados a las proteínas de los aislados.

Los porcentajes de lípidos asociados a los aislados proteicos A y B fueron un 3.4 y un 1.0%, respectivamente (Tabla 7). Esta diferencia entre ambos se explica por los lavados con etanol y acetona, que reducen el contenido lipídico del aislado B, respecto al A. La mayor parte de estos lípidos (casi el 90%) fueron lípidos polares, es decir, glucolípidos y fosfolípidos (Tabla 11).

Tabla 11. Determinación cuantitativa de los lípidos neutros y polares presentes en la harina de garbanzo y en los aislados proteicos A y B. Los datos están expresados como porcentaje de lípidos totales.

	Lípidos neutros	Lípidos polares
Harina de garbanzo	13.4 ± 2.2 ^a	86.6 ± 2.2
Aislado A	11.6 ± 1.6	88.4 ± 1.6
Aislado B	11.9 ± 0.3	88.1 ± 0.3

a: Los datos son la media ± desviación estandar de 3 determinaciones.

Este predominio de los lípidos polares era previsible ya que se ha partido de una harina de garbanzo que se ha extraído con hexano, que es un disolvente adecuado para extraer los lípidos neutros pero no los lípidos polares que necesitan disolventes más polares para que se extraigan cuantitativamente (Arêas *et al.*, 1993). Se empleó hexano para desengrasar la harina de garbanzo porque es el disolvente de elección en la preparación industrial de aislados proteicos (Waggle *et al.*, 1989). Los porcentajes de lípidos neutros y polares de la harina, 13.4 y 86.6%, respectivamente, se mantuvieron en los aislados A (11.6 y 88.4%, respectivamente) y B (11.9 y 88.1%, respectivamente), a pesar de que autores como Shenouda y Pigott (1974) afirman que los lípidos polares tienen mayor capacidad que los neutros para interaccionar con las proteínas durante la preparación de los aislados.

IV.4.1. Separación e identificación de las distintas clases de lípidos.

En las Figuras 31 y 32 se muestran las distintas clases de lípidos, tanto neutros como polares, presentes en la harina y en los aislados. Entre los lípidos neutros, los compuestos mayoritarios identificados fueron: Ceras, TAG, AGL, 1,3-DAG, 1,2-DAG, esteroides libres y alcoholes grasos libres. Los hidrocarburos que aparecen en la harina y en los aislados se debieron a impurezas de los disolventes utilizados. Los lípidos polares mayoritarios fueron EGE, EG y DGDG, entre los glucolípidos, y FE, FC y FI entre los fosfolípidos.

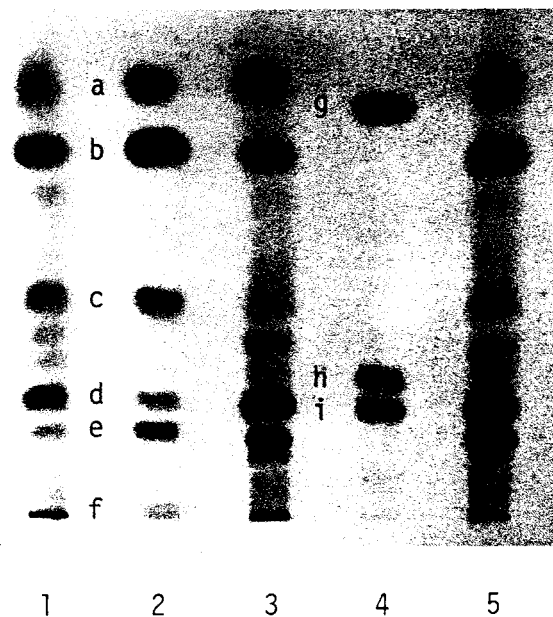


Figura 31. Separación mediante CCF en silicagel 60G de los lípidos neutros asociados a la harina de garbanzo (calle 1), aislado A (calle 3) y aislado B (calle 5). En la calle 2 aparecen los patrones de hidrocarburos (a), TAG (b), AGL (c), 1,3-DAG (d), 1,2-DAG (e) y 2-monoglicéridos (f). En la calle 4 aparecen los patrones de ceras (g), alcoholes grasos (h) y esteroides libres (i). Desarrollo con hexano: éter dietílico: ácido fórmico (80: 20: 1) y revelado quemando la placa tras rociar con ácido sulfúrico al 50%.

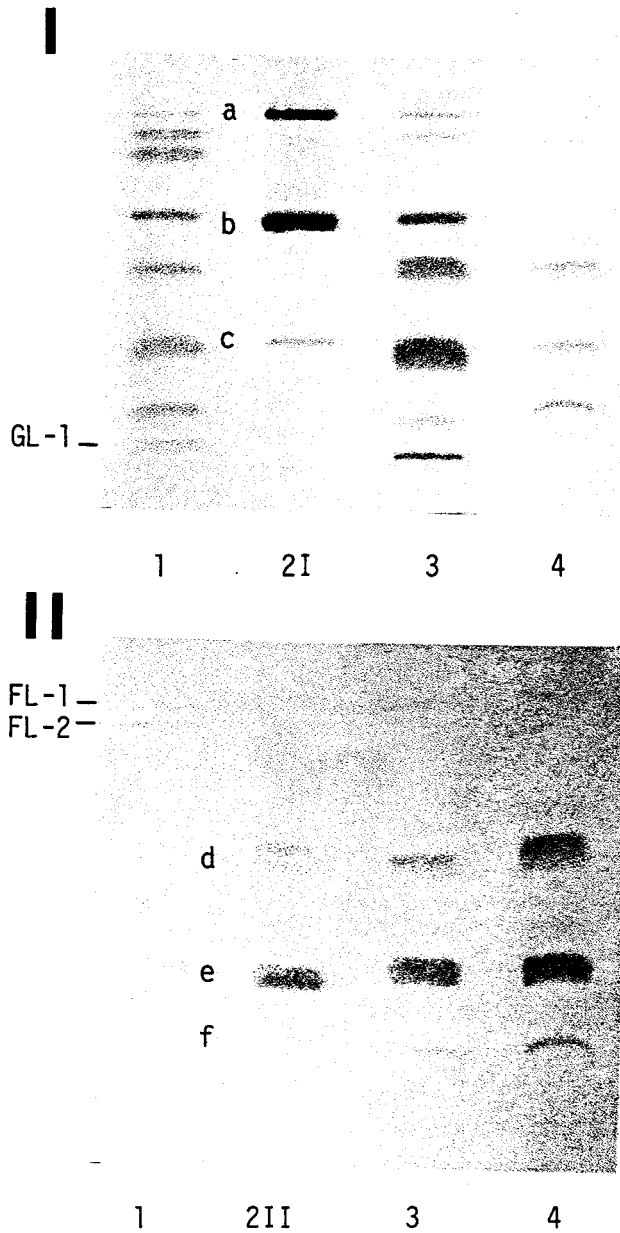


Figura 32. Separación mediante CCF en silicagel 60A de los lípidos polares asociados a la harina de garbanzo (calle 1), aislado A (calle 3) y aislado B (calle 4). En la calle 2I aparecen los patrones EGE (a), EG (b) y DGDG (c). En la calle 2II aparecen los patrones de FE (d), FC (e) y FI (f). Desarrollo con cloroformo: metanol: ácido acético: agua (85: 15: 10: 3). Revelado: (I) quemando la placa tras rociar con sulfúrico al 50%; (II) rociando con el reactivo específico de Vaskovsky y Kostetsky para la detección de fosfolípidos.

FL-1 y FL-2: Fosfolípidos no identificados. GL-1: Glucolípido no identificado.

No fue posible la identificación de 2 fosfolípidos cuyos Rf fueron 0.69 y 0.73, y que se encontraron en mayor proporción en la harina que en los aislados. Igualmente tampoco se pudo identificar un glucolípido ($R_f = 0.04$).

Debido a la complejidad de la composición en lípidos polares presentes en las plantas (Kates, 1986c), y a la escasa bibliografía de los mismos en la semilla del garbanzo, la identificación mediante CCF no es suficiente y puede conducir a error. Para confirmar la identificación se realizaron una serie de pruebas adicionales. El inositol y la glucosa que se encuentran unidos a grupos fosfato (FI) y esterol (EG), respectivamente, fueron identificados por hidrólisis de los correspondientes compuestos y comparación mediante CG con las sustancias patrón (Figura 33). El tiempo de retención del inositol fue de 19.96 min y el de la glucosa 21.39 min. De igual forma se determinó la glucosa procedente del EGE y la galactosa ($t_r = 22.09$ min) del DGDG. La identidad de la FE se confirmó hidrolizándola en medio ácido y aislando la etanolamina, cuyo tiempo de retención en HPLC, 23.31 min, coincidió con el de la sustancia patrón (Figura 34). La identidad de la FC se confirmó mediante CCF bidimensional, solapándose este fosfolípido y la sustancia patrón en una única mancha.

IV.4.2. Determinación cuantitativa de las distintas clases de lípidos.

Los TAG y DAG fueron los lípidos neutros mayoritarios en la harina y los aislados (Tabla 12). Los porcentajes de cada una de las clases de lípidos neutros presentes en el aislado A y en el B fueron relativamente parecidos entre sí, excepto en el contenido de TAG (32.7 y 45.2% en los aislados A y B, respectivamente) y en el de esteroles libres (19.1% en el aislado A y 4.0% en el B). Respecto a la harina de garbanzo, en los aislados se produjo una disminución en el porcentaje de TAG y de los AGL y un aumento de los 1,2-DAG y los esteroles libres. El resto de compuestos no variaron apenas sus porcentajes. Las causas de estas diferencias en los porcentajes de los lípidos neutros entre la harina y los aislados podrían ser varias. Por un lado, si enzimas

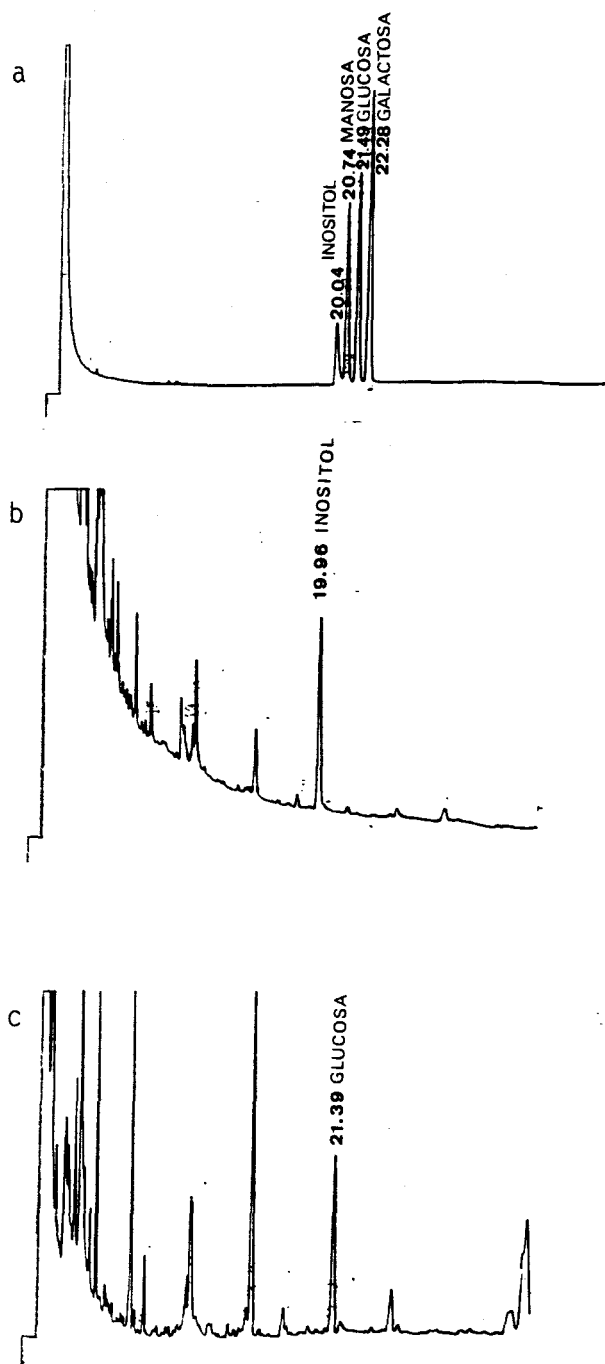


Figura 33. Identificación mediante CG del inositol y la glucosa procedentes de las respectivas hidrólisis del FI (b) y el EG (c) por comparación con las sustancias patrón (a).

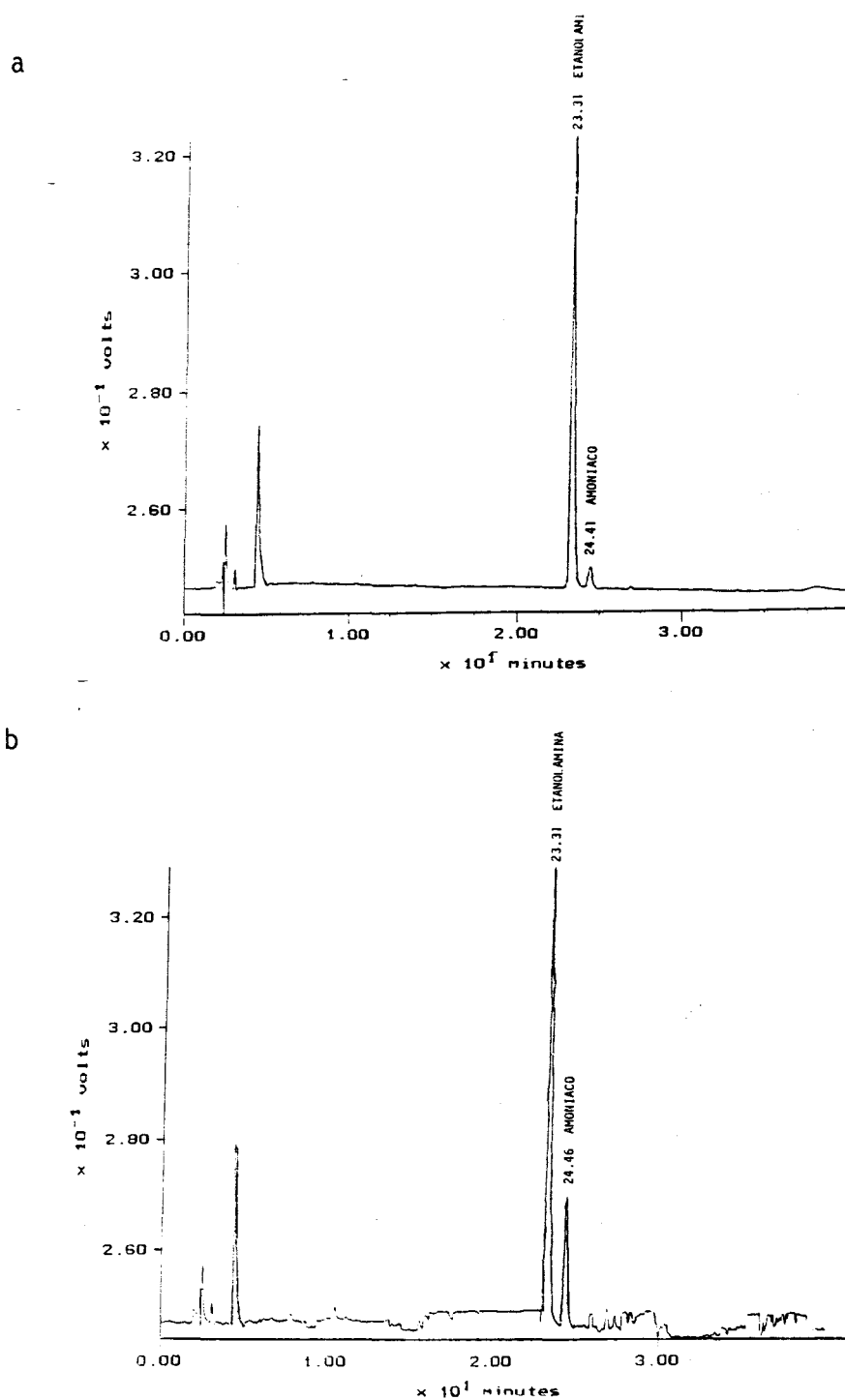


Figura 34. Identificación mediante HPLC de la etanolamina procedente de la hidrólisis de la FE (b) por comparación con la sustancia patrón (a).

Tabla 12. Determinación cuantitativa de las clases de lípidos neutros asociados a la harina de garbanzo y a los aislados proteicos A y B. Los datos están expresados como porcentaje de lípidos neutros totales.

	Harina de garbanzo	Aislado A	Aislado B
Ceras	trazas	trazas	trazas
Triglicéridos	64.1 ± 1.3 ^a	32.7 ± 1.1	45.2 ± 1.3
Acidos grasos libres	11.9 ± 1.5	5.0 ± 1.2	4.2 ± 1.0
1,3-Diglicéridos	14.6 ± 2.2	18.8 ± 2.5	16.0 ± 2.3
1,2-Diglicéridos	6.4 ± 1.0	23.2 ± 2.5	29.8 ± 1.2
Alcoholes grasos	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Esteroles libres	2.0 ± 0.2	19.1 ± 2.3	4.0 ± 0.9

a: Los datos son la media ± desviación standard de 2 determinaciones.

como las lipasas y lipoxigenasas no se han inactivado completamente durante el desengrasado de la harina, podrían actuar sobre los lípidos de la harina durante la elaboración de los aislados. Las lipasas producirían un incremento en el contenido de AGL y una disminución de los TAG (Liukkonen *et al.*, 1992), y la lipoxigenasa la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, tanto libres como, en menor medida, esterificados (Hatanaka *et al.*, 1987). Por otro lado, la autooxidación lipídica también actuaría degradando los lípidos más insaturados, y por último, la capacidad de asociarse a las proteínas de cada una de las clases de lípidos neutros estaría influida por sus diferentes estructuras químicas (Shenouda y Pigott, 1974).

El contenido de FC representó más de la mitad del contenido total en lípidos polares asociados a la harina y a los aislados, mientras que los glucolípidos fueron minoritarios (Tabla 13). El contenido de FE de los aislados experimentó un notable incremento respecto a la harina, acompañado de una disminución del FI. Al igual que con los lípidos neutros, la actuación de enzimas y la autooxidación podrían modificar los lípidos de la harina variando sus porcentajes

iniciales. Berger *et al.* (1971) atribuyen el grado de interacción entre lípido y proteína a las distintas disposiciones de los fosfolípidos en solución acuosa. Así establecen que los fosfolípidos que se organizan en micelas, como la lisofosfatidilcolina, se unen más fuertemente a las proteínas que los constituidos en lamelas, como son la fosfatidilcolina y la fosfatidilserina. La diferente estructura química del inositol, la etanolamina y la colina, presentes en los 3 tipos de fosfolípidos identificados, debería conducir a distintos tipos de enlaces (hidrofóbicos, electrostáticos, puentes de hidrógeno, etc) con las proteínas del garbanzo, y por tanto, a distintos grados de asociación (Chapman, 1969).

Tabla 13. Determinación cuantitativa de las clases de lípidos polares asociados a la harina de garbanzo y a los aislados proteicos A y B. Los datos están expresados como porcentaje de lípidos polares totales.

	Harina de garbanzo	Aislado A	Aislado B
Fosfatidiletanolamina	7.6 ± 2.7 ^a	19.0 ± 2.6	32.8 ± 1.8
Fosfatidilcolina	62.5 ± 4.1	72.4 ± 1.4	57.4 ± 1.3
Fosfatidilinositol	26.4 ± 1.3	6.8 ± 1.2	8.6 ± 3.0
Esterol glucósido esterificado	trazas	trazas	trazas
Esterol glucósido	3.5 ± 0.6	1.8 ± 0.7	1.2 ± 0.2
Digalactosildiglicérido	trazas	trazas	trazas

a: Los datos son la media ± desviación standard de 2 determinaciones.

IV.4.3. Análisis de los ácidos grasos, alcoholes grasos y esteroides de las distintas clases de lípidos.

Los ácidos grasos predominantes en los TAG y DAG de la harina de garbanzo fueron los insaturados, principalmente oleico y linoleico, como ocurre con otras leguminosas (Vioque y Maza, 1970), incluyendo distintas variedades de garbanzo (Sosulski y Gadan, 1988) (Tabla 14).

Tabla 14. Composición en ácidos grasos de los lípidos neutros asociados a la harina y a los aislados proteicos A y B. Los datos están expresados en porcentaje de ácidos grasos totales.

	C 14:0	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3
Ceras						
Harina	3.0 ± 0.1 ^a	50.0 ± 1.4	24.3 ± 0.9	16.2 ± 0.7	6.5 ± 0.1	trazas
Aislado A	5.6 ± 0.1	54.4 ± 1.2	24.3 ± 0.3	14.5 ± 0.5	1.2 ± 0.1	trazas
Aislado B	2.9 ± 0.1	59.9 ± 1.6	19.6 ± 1.3	12.0 ± 0.7	5.6 ± 0.7	trazas
Triglicéridos						
Harina	1.0 ± 0.1	14.4 ± 0.1	2.3 ± 0.1	26.2 ± 0.1	53.6 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Aislado A	1.5 ± 0.1	13.4 ± 1.1	3.0 ± 0.1	23.5 ± 0.3	55.9 ± 0.6	2.7 ± 0.2
Aislado B	trazas	15.9 ± 0.1	1.8 ± 0.1	23.7 ± 0.1	56.7 ± 0.1	1.9 ± 0.1
Ácidos grasos libres						
Harina	2.7 ± 0.5	25.2 ± 3.7	7.5 ± 2.5	24.1 ± 0.1	38.7 ± 7.1	1.5 ± 0.2
Aislado A	7.0 ± 0.3	32.6 ± 0.2	13.2 ± 0.6	25.6 ± 1.4	21.6 ± 1.5	trazas
Aislado B	2.1 ± 0.1	25.7 ± 0.8	5.1 ± 0.1	15.8 ± 0.7	51.3 ± 1.3	trazas
1,3-Diglicéridos						
Harina	2.0 ± 0.2	21.8 ± 0.6	6.1 ± 0.8	37.5 ± 0.8	31.6 ± 0.3	1.0 ± 0.1
Aislado A	3.2 ± 0.1	48.6 ± 0.8	7.0 ± 0.3	13.5 ± 1.1	27.7 ± 0.1	trazas
Aislado B	1.2 ± 0.1	41.0 ± 1.0	4.9 ± 0.1	15.3 ± 0.3	36.6 ± 0.8	1.0 ± 0.1
1,2-Diglicéridos						
Harina	trazas	29.9 ± 0.2	5.0 ± 0.2	29.4 ± 0.4	34.7 ± 0.4	1.0 ± 0.1
Aislado A	1.5 ± 0.1	54.4 ± 0.2	6.9 ± 0.1	14.8 ± 0.3	22.4 ± 0.1	trazas
Aislado B	trazas	57.6 ± 0.1	4.3 ± 0.1	11.8 ± 0.1	26.3 ± 0.1	trazas

a: Los datos son la media ± desviación estandar de 2 determinaciones.

En cambio, los ácidos grasos de las ceras fueron en su mayoría saturados, principalmente palmítico y esteárico. Una composición similar ha sido observada en las ceras de *Coincya* sp (Vioque *et al.*, 1995). Esta diferencia en la composición de ácidos grasos entre los TAG y ceras podría deberse a la distinta localización en la planta. Las ceras, en contacto con el exterior, estarían compuestas por ácidos grasos saturados que son poco susceptibles a la oxidación, mientras que los ácidos grasos de los TAG, al estar almacenados en los oleosomas, estarían protegidos de los factores ambientales. Respecto a la harina de garbanzo, los DAG y las ceras de ambos aislados, y los AGL del aislado A mostraron una disminución en su porcentaje de ácidos grasos insaturados. Esto parece sugerir que, durante la preparación de los aislados, estos lípidos presentes en la harina se han oxidado, bajando sus contenidos en ácidos grasos insaturados. La oxidación parcial de los lípidos ha sido observada en la preparación de aislados a partir de harinas de girasol (Millán *et al.*, 1983) y altramuz (Millán *et al.*, 1995). Los TAG presentes en ambos aislados, y los AGL del aislado B, no variaron de forma significativa los contenidos de ácidos grasos insaturados respecto a la harina.

Los ácidos grasos mayoritarios en los lípidos polares fueron el palmítico, oleico y linoleico (Tabla 15). Sin embargo, en los lípidos de membrana, como son los fosfolípidos y glucolípidos, los ácidos grasos mayoritarios son el linoleico y el linolénico (Joyard *et al.*, 1991). Este menor contenido de linolénico en la harina de garbanzo podría deberse a la actuación de las enzimas una vez trituradas las semillas (Kates, 1986a). Respecto a la harina de garbanzo, no se observó en ninguna de las clases de lípidos polares asociados a los aislados, una disminución lo suficientemente clara en el porcentaje de los ácidos grasos insaturados que nos indujera a pensar en una oxidación de éstos durante la obtención de los aislados proteicos.

Los alcoholes grasos (Tabla 16), tanto libres como esterificados (ceras), presentaron un número par de átomos de carbono, con una longitud de cadena entre 16 y 28 átomos de carbono, siendo todos saturados excepto el C_{18:1}. Los mayoritarios fueron los de cadena más corta, el C_{16:0} (18.3-24.2%) y el C_{18:0} (28.1-38.1%). Las mayores diferencias entre los alcoholes libres y los

Tabla 15. Composición en ácidos grasos de los lípidos polares asociados a la harina y a los aislados proteicos A y B. Los datos están expresados en porcentaje de ácidos grasos totales.

	C 14:0	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3
Fosfatidiletanolamina						
Harina	trazas	17.2 ± 0.1 ^a	2.6 ± 0.1	28.7 ± 0.1	50.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1
Aislado A	1.5 ± 0.1	16.0 ± 0.1	3.0 ± 0.5	28.0 ± 0.1	50.2 ± 0.3	1.3 ± 0.1
Aislado B	trazas	20.7 ± 0.1	2.6 ± 0.1	31.9 ± 0.1	44.8 ± 0.1	trazas
Fosfatidilcolina						
Harina	trazas	14.7 ± 0.5	2.2 ± 0.1	31.4 ± 0.4	50.4 ± 0.8	1.3 ± 0.1
Aislado A	1.6 ± 0.1	24.1 ± 0.1	4.6 ± 0.1	24.8 ± 0.3	43.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Aislado B	trazas	15.1 ± 0.1	2.7 ± 0.1	34.6 ± 0.1	46.6 ± 0.3	1.0 ± 0.1
Fosfatidilinositol						
Harina	trazas	41.6 ± 0.5	2.1 ± 0.1	13.3 ± 0.1	41.5 ± 0.4	1.5 ± 0.1
Aislado A	3.5 ± 0.6	38.0 ± 0.3	4.0 ± 1.1	16.0 ± 0.3	37.0 ± 0.5	1.5 ± 0.1
Aislado B	trazas	45.4 ± 0.2	6.4 ± 0.1	12.8 ± 0.6	35.4 ± 0.3	trazas
Esterol glucosido esterificado						
Harina	trazas	35.9 ± 1.8	13.2 ± 0.4	17.3 ± 0.4	33.6 ± 0.8	trazas
Aislado A	trazas	33.8 ± 0.1	9.3 ± 0.7	20.3 ± 0.7	36.6 ± 1.3	trazas
Aislado B	trazas	61.0 ± 1.1	14.2 ± 0.3	15.0 ± 0.1	9.8 ± 1.2	trazas
Digalactosildiglicérido						
Harina	trazas	36.9 ± 0.1	3.8 ± 0.1	14.7 ± 0.1	42.5 ± 0.1	2.1 ± 0.1
Aislado A	trazas	36.9 ± 1.1	3.4 ± 0.1	13.1 ± 0.3	44.0 ± 0.6	2.6 ± 0.1
Aislado B	trazas	36.7 ± 0.4	3.6 ± 0.1	14.6 ± 0.1	43.1 ± 0.3	2.0 ± 0.1

a: Los datos son la media ± desviación estandar de 2 determinaciones.

esterificados se observaron en los contenidos de C_{18:1}, ya que en los primeros sólo se encontraron trazas de este alcohol insaturado. Así mismo, y sobre todo en el aislado A, se observó una gran disminución de este alcohol cuando comparamos su porcentaje con el encontrado en la harina.

Tabla 16. Composición en alcoholes grasos de los lípidos asociados a la harina y a los aislados proteicos A y B. Los datos están expresados en porcentaje de alcoholes grasos totales.

	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 20:0	C 22:0	C 24:0	C 26:0	C28:0
Alcoholes grasos libres								
Harina	24.2 ± 0.8 ^a	34.5 ± 0.9	trazas	7.4 ± 0.2	14.6 ± 0.2	5.6 ± 0.3	trazas	13.7 ± 1.5
Aislado A	22.0 ± 2.0	34.2 ± 2.0	trazas	8.8 ± 1.2	14.6 ± 1.6	5.9 ± 0.5	trazas	14.5 ± 3.0
Aislado B	22.4 ± 2.1	38.1 ± 2.9	trazas	5.5 ± 0.3	12.6 ± 0.4	4.2 ± 0.2	trazas	17.2 ± 4.9
Ceras								
Harina	21.4 ± 0.6	29.2 ± 1.1	12.9 ± 0.2	7.2 ± 0.2	10.3 ± 0.1	4.2 ± 0.2	2.6 ± 0.1	12.2 ± 1.7
Aislado A	20.6 ± 0.3	35.3 ± 0.1	6.0 ± 2.4	11.6 ± 0.3	13.0 ± 0.7	5.1 ± 0.3	trazas	8.4 ± 1.4
Aislado B	18.3 ± 0.7	28.1 ± 0.1	9.2 ± 0.6	8.8 ± 0.1	10.8 ± 0.3	4.5 ± 0.2	3.1 ± 0.3	17.2 ± 0.1

^a Los datos son la media ± desviación estandar de 2 determinaciones.

Estas diferencias podrían deberse a la oxidación de este alcohol insaturado durante la preparación de los aislados proteicos, de forma análoga a como parece ocurrir con los ácidos grasos insaturados.

Los esteroides libres, y los que forman parte de los EG y EGE, estuvieron mayoritariamente representados (entre un 76.7 y un 86.1% de los esteroides totales) por el β -sitosterol, que es el esteroide más abundante en el reino vegetal, junto con el campesterol y el estigmasterol (Benveniste, 1986) (Tabla 17).

Tabla 17. Composición en esteroides de los lípidos asociados a la harina y a los aislados proteicos A y B. Los datos están expresados en porcentaje de esteroides totales.

	β -Sitosterol	Campesterol	Estigmasterol	δ -5-Avenasterol
Esteroides libres				
Harina garbanzo	76.7 \pm 1.9 ^a	11.3 \pm 0.1	8.5 \pm 0.6	3.5 \pm 0.1
Aislado A	77.3 \pm 0.1	13.5 \pm 0.1	7.8 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1
Aislado B	79.2 \pm 0.3	12.1 \pm 0.3	7.1 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1
Esteroides glucósidos				
Harina garbanzo	83.4 \pm 0.1	10.0 \pm 0.1	5.4 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
Aislado A	83.1 \pm 0.6	10.3 \pm 0.6	5.6 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
Aislado B	86.1 \pm 0.1	8.4 \pm 0.1	4.7 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1
Esteroides glucósidos esterificados				
Harina garbanzo	83.3 \pm 0.2	8.5 \pm 0.2	6.0 \pm 0.4	2.2 \pm 0.1
Aislado A	85.7 \pm 0.2	9.3 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	Trazas
Aislado B	83.8 \pm 1.1	8.6 \pm 0.7	5.6 \pm 0.5	2.0 \pm 0.1

a: los datos son la media \pm desviación estándar de 2 determinaciones.

Los porcentajes de cada uno de los esteroides identificados fueron muy similares en la

harina y en los aislados, siendo el δ -5-avenasterol el que mostró mayor variación, con un mayor contenido en la harina.

Hemos visto, a partir de los resultados obtenidos, que los porcentajes de las distintas clases de lípidos asociados a los aislados proteicos del garbanzo, son en algunos casos, muy distintos de los de la harina original. También parece claro que algunos de estos lípidos se oxidan durante la preparación de los aislados mientras que otros parecen no afectarse. No obstante, esta oxidación lipídica no es capaz de explicar las diferencias encontradas en algunas clases de lípidos entre la harina y los aislados. Así, aunque algunos lípidos como los ácidos grasos del aislado A parecen oxidarse y disminuir su porcentaje respecto a la harina, otros no se oxidan y baja su contenido drásticamente, como es el caso del FI, e incluso algunos, como los 1,2-DAG, se oxidan y aumenta espectacularmente su porcentaje en los aislados. En cualquier caso, e independientemente de los porcentajes de cada lípido, la preparación de aislados a partir de semillas de garbanzo mediante extracción alcalina de las proteínas y posterior precipitación de las mismas en su pI, conlleva la presencia de un heterogéneo grupo de lípidos. Estos lípidos, con un gran contenido en ácido grasos poliinsaturados, se reducen en gran medida con los lavados con etanol y acetona, lo cual permite pensar en una mayor estabilidad en la conservación del aislado B respecto al A.

IV.4. Estudio de la interacción entre la proteína legumín y los productos de oxidación lipídica del ácido linoleico, la trilinoleína y la fosfatidilcolina.

El objetivo de este apartado fue el estudio de los cambios que se podrían producir en los aislados proteicos durante el almacenamiento y/o procesado, como consecuencia de la interacción de las proteínas con los productos de oxidación de los lípidos asociados. Debido a la complejidad y al tiempo necesario para este estudio, se simplificó empleando incubaciones modelo estandarizadas entre proteínas y lípidos. Esta mezcla lípido-proteína se sometió a oxidación en unas condiciones relativamente suaves (37°C y pH 9.0) para que las posibles modificaciones producidas en la proteína fueran, en la medida de lo posible, un reflejo de la realidad. La proteína que se utilizó fue el legumín, ya que es la mayoritaria en los aislados proteicos del garbanzo. Esta proteína además presenta una serie de características que la hacen muy interesantes para este tipo de estudios como son la presencia de dominios hidrófobos (subunidades β) e hidrófilos (subunidades α), así como la existencia en su estructura de enlaces covalentes, disulfuro y débiles. Por estos motivos, en principio, cabe preverse una gran diversidad de modificaciones del legumín por su interacción con los productos de oxidación lipídica. Los lípidos utilizados en los ensayos fueron los más representativos de entre los que se encontraron asociados a los aislados proteicos del garbanzo. Así, se incubó con el ácido linoleico, el ácido graso predominante en los lípidos asociados, y la trilinoleína y la fosfatidilcolina, que representan los lípidos neutros y polares, respectivamente, más abundantes en los aislados. Con los datos obtenidos a partir de estas incubaciones se pretende ver también el efecto que produce el ácido linoleico cuando está libre, esterificado en un triglicérido o formando parte de un fosfolípido.

IV.4.1. Filtración en gel y electroforesis.

Las condiciones modelo elegidas para las incubaciones lípido-proteína están descritas en el apartado III.3.28 y son las mismas empleadas por Millán (1983) para el estudio de las interacciones entre el 13-hidroperóxido del ácido linoleico y diferentes proteínas. En todas las

condiciones que la muestra problema pero sin añadirle el lípido. En ninguno de los ensayos el control mostró diferencia alguna respecto a la proteína legumín original. Esto confirmó que los cambios que se dieron en el legumín se deben exclusivamente a los productos de oxidación de los lípidos, y no a las condiciones de la incubación.

El tiempo de incubación fue de 7 días, tomándose muestras cada 24 hr que se analizaron por PAGE para comprobar si se producían cambios en la proteína por su interacción con los productos de oxidación lipídica. El legumín incubado tanto con la fosfatidilcolina como con la trilinoleína no mostró ninguna variación en su perfil electroforético a lo largo de la incubación y fue siempre idéntico al del control (Figura 35). Los cambios más drásticos se observaron cuando se incubó el legumín con el ácido linoleico (Figura 36). A partir de las primeras 24 hr, el legumín desapareció completamente formándose una serie de bandas difusas, con Rf mayores al del legumín original. Todas estas bandas, conforme aumenta el tiempo de incubación, fueron desapareciendo de manera que al final, prácticamente toda la proteína migró con el frente de la electroforesis. En una electroforesis nativa, las proteínas migran a lo largo del gel en función de su carga eléctrica neta, peso molecular y forma. Por tanto, en la incubación del legumín con el ácido linoleico ha podido ocurrir que, o bien haya habido rotura de la proteína (Matoba *et al.*, 1984), formándose fragmentos de menor peso molecular y por tanto de mayor Rf, o bien que la interacción con los productos de oxidación del ácido linoleico provoque cambios en la forma y/o carga neta del legumín modificando su movilidad a lo largo del gel. Cambios de este tipo se han observado en la BSA, cuyo pI se altera como resultado de su incubación con el hidroperóxido del ácido linoleico (Millán, 1983). Se compararon los perfiles del control frente a la incubación a 48 hr, obtenidos mediante filtración en gel y medidos como absorbancia a 596 nm tras reaccionar las proteínas con el reactivo de Bradford (Figura 37). En ambos casos el perfil fue prácticamente idéntico, con un pico mayoritario cuyo volumen de elución ($V_e=13-14$ ml) corresponde al del legumín. No aparecieron otros picos de mayor V_e que indicaría la presencia de proteínas de menor peso molecular procedentes de la rotura del legumín, excepto uno ($V_e=19$ ml) pero que no puede deberse a la interacción con los productos de oxidación del linoleico ya que también apareció en

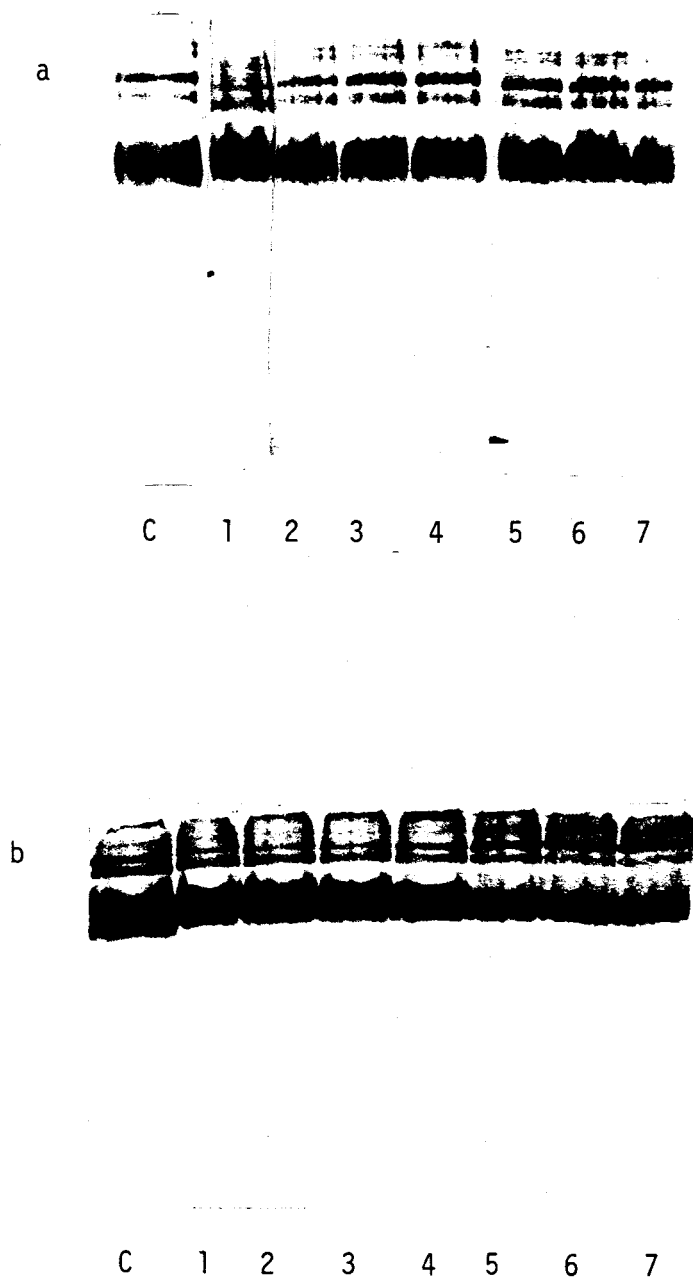


Figura 35. PAGE de la incubación de la proteína legumín en las condiciones modelo con: la fosfatidilcolina (a), y la trilinoleina (b). El tiempo de incubación fue de 7 días, correspondiendo el número de la calle al de días de incubación. El control aparece en la calle C.

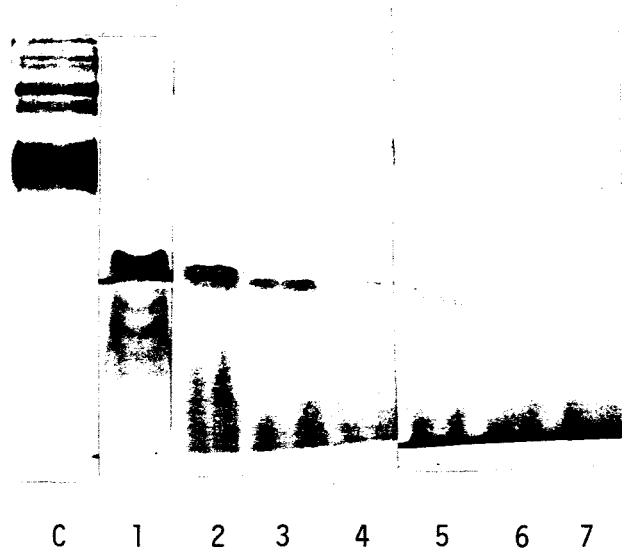


Figura 36. PAGE de la incubación de la proteína legumín en las condiciones modelo con el ácido linoleico. El tiempo de incubación fue de 7 días, correspondiendo el número de la calle al de días de incubación. El control aparece en la calle C.

el control. Por tanto parece que la incubación del ácido linoleico con el legumín durante 48 hr no produjo rotura de la proteína y que los cambios observados en PAGE, respecto al control, se deben a alteraciones en la carga eléctrica neta y/o desnaturalización de la proteína.

Mientras que la incubación del legumín con el ácido linoleico provocó importantes cambios en la proteína, incluso en las primeras 24 hr, cuando se sustituyó este ácido graso por trilinoleína o por FC, no se observaron modificaciones en el legumín. Esto podría deberse a una menor oxidación de estos lípidos, y por tanto, a una menor concentración de los productos de oxidación, responsables de los daños a la proteína. Cuando se midió, mediante cromatografía gaseosa, la evolución del contenido de los ácidos grasos insaturados durante la incubación, se observó que el 30.1% del ácido linoleico se había oxidado a las 48 hr, siendo la oxidación del

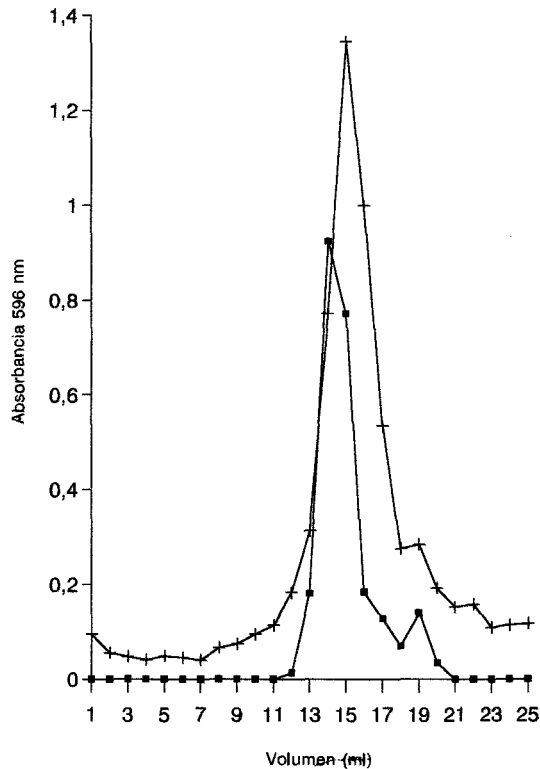


Figura 37. Perfiles obtenidos mediante filtración en gel (Superose 6) del control (■) y del legumín incubado con el ácido linoleico (+) en las condiciones modelo durante 48 hr. Los registros están obtenidos midiendo la absorbancia a 596 nm, tras reaccionar las proteínas con el reactivo de Bradford.

91.2% a los 7 días de incubación. La trilinoleína no se oxidó a las 48 hr, pero el 98.5% se había oxidado al final del periodo de incubación. Sin embargo, esta oxidación no pareció reflejarse en un daño a la proteína, al menos en lo que respecta a la PAGE. La composición en ácidos grasos de la FC no se modificó durante la incubación, indicando que no ha habido oxidación (Tabla 18). Esto explica porque la FC no provocó daños en el legumín. Las diferencias tan importantes encontradas en la oxidación de los ácidos grasos de los triglicéridos y de los fosfolípidos podrían deberse a su distinta disposición en los medios acuosos. Los fosfolípidos, al ordenar al exterior sus grupos polares, dificultarían el acceso del oxígeno hacia el interior donde se encuentran las cadenas de los ácidos grasos, mientras que los triglicéridos, al no presentar grupo polar, no

Tabla 18. Composición en ácidos grasos de la fosfatidilcolina a tiempo cero y tras 7 días de incubación con el legumín en las condiciones modelo. Los datos están expresados en porcentaje de ácidos grasos totales.

	Tiempo cero	7 días incubación
Palmitico	22.4 ± 1.4 ^a	21.2 ± 1.6
Estearico	4.8 ± 0.2	4.7 ± 0.3
Oleico	7.6 ± 0.4	7.8 ± 0.4
Linoleico	58.6 ± 1.2	59.4 ± 0.7
Linolénico	6.6 ± 0.3	6.9 ± 0.1

a: Los datos son la media ± desviación estandar de 2 determinaciones.

protegerían sus ácidos grasos de la oxidación.

IV.4.2. Análisis de aminoácidos.

Los únicos aminoácidos que aparentemente disminuyeron por efecto de esta oxidación fueron el ácido aspártico y la histidina (Tabla 19). El primero redujo su contenido en un 5.2% respecto al control, pero esta diferencia es atribuible al error de la medida en sí. En cambio, la histidina si decreció en un porcentaje importante, un 24.3%. En diversos trabajos (Gardner, 1983; Alaiz y Girón, 1994) se ha mostrado como este aminoácido es sensible a la interacción con los lípidos oxidados.

Cuando estas mismas muestras se hidrolizan en medio básico, en vez de con clorhídrico, y los aminoácidos resultantes son analizados por HPLC, se pudo comprobar como la metionina del legumín incubado con el ácido linoleico, prácticamente había desaparecido, pasando de 1.6 g por cada 100 g de proteína en el control, a sólo 0.3 g tras la incubación con el lípido (Tabla 20).

Tabla 19. Análisis de aminoácidos (hidrólisis ácida) del legumín incubado en las condiciones modelo con y sin (control) el ácido linoleico durante 48 hr. Los datos están expresados en gramos por cada 100 g de proteína.

	Control	Legumín + ac. linoleico
Aspártico + Asparagina	13.6 ± 0.3 ^a	12.9 ± 0.2
Glutámico + Glutamina	22.4 ± 0.2	23.0 ± 0.1
Serina	7.2 ± 0.1	7.6 ± 0.1
Histidina	3.7 ± 0.1	2.8 ± 0.1
Glicina	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.1
Treonina	3.5 ± 0.1	3.4 ± 0.1
Arginina	17.1 ± 0.1	17.7 ± 0.1
Alanina	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1
Tirosina	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.1
Valina	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1
Metionina	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1
Cisteina	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Isoleucina	5.1 ± 0.1	5.2 ± 0.1
Leucina	8.8 ± 0.2	9.2 ± 0.1
Fenilalanina	7.5 ± 0.2	7.8 ± 0.1
Lisina	5.9 ± 0.1	6.0 ± 0.1

a: Los datos son la media ± desviación estandar de 2 incubaciones independientes.

Esta pérdida (81.3%) probablemente se deba a la conversión de la metionina en sulfóxido de metionina ya que éste es el principal compuesto de degradación de este aminoácido cuando reacciona con los lípidos peroxidantes (Cuq *et al.* 1978). Esta transformación explicaría también porque en la hidrólisis con clorhídrico de las proteínas no se aprecia disminución en el contenido de metionina, ya que cuando se hidroliza en medio ácido, el sulfóxido de metionina revierte a metionina (Schachter *et al.*, 1963). Aunque el sulfóxido de metionina puede ser al menos en parte

Tabla 20. Valores de metionina, lisina asimilable y digestibilidad proteica *in vitro* del legumín incubado en las condiciones modelo con y sin (control) el ácido linoleico durante 48 hr.

	Control	Legumín + ac. linoleico
Metionina ^a	1.6 ± 0.0 ^d	0.3 ± 0.0
Lisina asimilable ^b	100	112.8 ± 3.0
Digestibilidad proteica ^c	84.1 ± 1.0	69.2 ± 1.8

a: En g por cada 100 g de proteína.

b: En porcentaje respecto al control.

c: Porcentaje de proteína digerible.

d: Los datos son la media ± desviación estandar de 2 incubaciones independientes.

utilizable para la síntesis proteica (Nielsen *et al.*, 1985a), el legumín es una proteína relativamente escasa en aminoácidos azufrados y cualquier disminución en la biodisponibilidad de los mismos puede afectar claramente su valor nutricional.

IV.4.3. Lisina asimilable.

No se observó disminución en los valores de lisina asimilable del legumín tras su incubación con el ácido linoleico durante 48 hr, sino que incluso aumentó un 12.8% respecto al control (Tabla 20). Es de destacar que la lisina, un aminoácido que se considera sensible a las alteraciones por los lípidos oxidados (Davídek *et al.*, 1990), no decrezca en su contenido. No obstante se considera que las principales pérdidas de lisina suceden por su interacción con los productos secundarios de la oxidación lipídica y no por los radicales libres que se forman en los primeros estadios de la oxidación (Hidalgo *et al.* 1992). Esta posible ausencia de productos secundarios de oxidación podría ser también la causa de que no se hayan detectado polímeros del

legumín, que se forman sobre todo por condensaciones entre las lisinas de diferentes moléculas de proteína y los aldehídos (Chio y Tappel, 1969).

IV.4.5. Digestibilidad proteica *in vitro*

La digestibilidad del legumín se vio claramente afectada por su incubación con el ácido linoleico. A las 48 hr de incubación, la digestibilidad proteica *in vitro* había pasado de un 84.1% a un 69.2% (Tabla 20). En incubaciones de la BSA con el 13-hidroperóxido del ácido linoleico se han observado similares pérdidas de digestibilidad, que se han relacionado con fenómenos de polimerización proteica (Millán, 1983). Estos polímeros, de difícil hidrólisis por los enzimas, serían los responsables de la baja digestibilidad de la BSA incubada. Sin embargo, el legumín no presentó polimerización tras su incubación con el ácido linoleico. Una posible explicación podría ser que esta disminución en la digestibilidad se deba a la formación de enlaces entre la proteína legumín y los productos de oxidación lipídica que dificulten el acceso de los enzimas digestivos a los enlaces peptídicos.

Los resultados obtenidos en las incubaciones del legumín con el ácido linoleico, la trilinoleína y la FC, permiten plantear una serie de hipótesis que se podrían extrapolar a los aislados proteicos. Los lípidos y las proteínas del garbanzo, tanto en la preparación de los aislados, como en el posterior almacenamiento y procesado de los mismos, van a sufrir una serie de tratamientos similares en parte a las condiciones de las incubaciones, como son el contacto prolongado con el aire, los tratamientos en medios acuosos alcalinos y los incrementos de temperatura. En principio, parece que no todos los lípidos asociados a los aislados van a modificar a las proteínas de igual forma. Los fosfolípidos, que son los lípidos mayoritarios en los aislados, parecen bastante resistentes a la oxidación lipídica, al menos en medios acuosos. Los TAG, aunque más sensibles a la oxidación, aparentemente no causaron daños en la proteína. Los causantes de las mayores pérdidas de valor nutricional del legumín parecen ser los ácidos grasos

libres insaturados, como el ácido linoleico. Este distinto grado de oxidación es similar al que se observó en los lípidos durante la preparación de los aislados, donde los ácidos grasos libres se oxidaron mientras que los TG y fosfolípidos no.

Las alteraciones proteicas se centraron principalmente en importantes pérdidas de aminoácidos esenciales como metionina, que probablemente se ha oxidado a sulfóxido de metionina, y de histidina. La disminución de metionina es especialmente crítica debido a los bajos niveles de este aminoácido en los aislados. Además de una menor disponibilidad de aminoácidos, los productos de oxidación del ácido linoleico son capaces de causar una serie de modificaciones en la conformación del legumín, apreciables mediante electroforesis, y que se traducen en una importante disminución de su digestibilidad.

Todo esto permite pensar que una disminución del contenido lipídico, y en especial de los ácidos grasos libres, en los aislados sería muy positivo en la mejora de la conservación de los aislados. Se ha propuesto evitar su liberación a partir de otros lípidos, inhibiendo, por ejemplo, a las lipasas de la harina (Liukkonen *et al.*, 1992). La inactivación de estas enzimas, y de otras igualmente importantes como las lipoxigenasas, se realiza habitualmente en la industria por tratamiento térmico (Youngs, 1978) pero esto conllevaría la insolubilización de parte de las proteínas (Anderson, 1992) y por tanto la disminución en la extracción de las mismas. Otras posibilidades para disminuir la oxidación lipídica son la utilización de condiciones menos oxidantes en la elaboración de los aislados, como un menor pH en la extracción de las proteínas (Murray *et al.*, 1978), y la disminución en el tiempo de preparación (por ejemplo, bajando la duración y el número de extracciones) para que el tiempo de contacto con el aire sea menor. En cualquier caso estas modificaciones darían lugar también a una disminución en los rendimientos de los aislados. Una alternativa sencilla es la que se ha realizado en este trabajo, consistente en extraer los aislados con disolventes con lo que se consigue disminuir el contenido lipídico sin bajar los rendimientos. Esto, junto con el uso de antioxidantes (Lamghari *et al.*, 1997), sería probablemente la mejor solución para aumentar el tiempo de conservación de los aislados proteicos.

V. CONCLUSIONES

1.- El método de fraccionamiento de las proteínas del garbanzo de Singh *et al.* (1988) es una primera etapa adecuada para purificación de la proteína legumín u 11S, ya que permite obtener de manera simple y rápida una fracción rica en globulinas que posteriormente se purifica fácilmente mediante intercambio aniónico y filtración en gel.

2.- Se han preparado 2 tipos de aislados a partir de la harina de garbanzo desengrasada en los que se recupera más del 60% del nitrógeno original. Respecto a la harina, estos aislados están enriquecidos en la proteína legumín y empobrecidos en albúminas ya que éstas se pierden en gran medida durante la precipitación isoelectrica de las proteínas del garbanzo.

3.- Como consecuencia del uso de sulfito sódico y de los lavados del aislado con etanol y acetona, el aislado denominado como B muestra un color prácticamente blanco y un mayor contenido proteico que el A.

4.- Los aislados muestran propiedades funcionales muy diferentes entre sí, con una mayor absorbancia de agua y grasa en el A, y una mayor solubilidad y capacidad de emulsión en el B.

5.- El aislado A muestra una disociación del legumín probablemente debido al pH utilizado para la extracción de las proteínas.

6.- Los aislados no son deficitarios en ningún aminoácido esencial según el patrón de la FAO de 1985, no obstante, respecto a la harina, están empobrecidos en lisina y aminoácidos azufrados como consecuencia de la disminución de las albúminas.

7.- La digestibilidad proteica *in vitro* de los aislados es superior a la de proteínas de alta calidad como la BSA. Esta elevada digestibilidad es en parte consecuencia de la disminución de las albúminas que son difícilmente hidrolizables por los enzimas digestivos.

8.- Los aislados proteicos contienen cantidades apreciables de lípidos asociados que se reducen de manera importante mediante los tratamientos con etanol y acetona. Estos lípidos son en casi un 90% por lípidos polares, y dentro de éstos más del 98% fueron fosfolípidos.

9.- Las distintas clases de lípidos que se han identificado en los aislados son: ceras, triglicéridos, ácidos grasos libres, 1,3-diglicéridos, 1,2-diglicéridos, alcoholes grasos, esteroides libres, esteroles glucósidos, esteroles glucósidos esterificados, digalactosildiglicéridos, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilinositol. Se han observado diferencias drásticas en los porcentajes de cada uno de estos lípidos entre la harina de partida y los aislados.

10.- Por comparación con la composición en ácidos grasos de la harina, se ha observado que las ceras, los ácidos grasos libres y los diglicéridos se oxidan parcialmente durante la preparación de los aislados.

11.- Los alcoholes grasos mayoritarios, tanto libres como esterificados en las ceras, que se han encontrado en la harina y en los aislados son el $C_{16:0}$ y el $C_{18:0}$. En los esteroides libres y los glicosilados, el β -sitosterol representa entre el 77 y el 86% de los esteroides totales de la harina y los aislados.

12.- A partir de las incubaciones modelo ensayadas se ha observado que la oxidación del ácido linoleico en medios acuosos depende en gran medida de que se encuentre libre, esterificado en un triglicérido, o formando parte de un fosfolípido. Mientras que el ácido linoleico libre se oxida en más de un 30% a los 2 días de incubación, la fosfatidilcolina no presenta oxidación tras 7 días. La trilinoleína es un caso intermedio de oxidación entre los dos anteriores.

13.- La oxidación del ácido linoleico causó una serie de modificaciones en la proteína legumin tales como la modificación de su perfil electroforético, la disminución de los aminoácidos esenciales histidina y metionina, y una menor digestibilidad proteica *in vitro*.

VI. BIBLIOGRAFIA

Abdel-Aal, E-S.M.; Shehata, A.A.; El-Mahdy, A.R.; Youssef, M.M. Extractibility and functional properties of some legume proteins isolated by three different methods. *J. Sci. Food Agric.* **1986**, *37*, 553-559.

Abo-Bakr, T.M. Nutritional evaluation of sausages containing chickpeas and faba beans as meat protein extenders. *Food Chem.* **1987**, *23*, 143-150.

Alaiz, M.; Giron, J. Modification of histidine residues in bovine serum albumin by reaction with (E)-2-octenal. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2094-2098.

Alaiz, M.; Navarro, J.L.; Giron, J.; Vioque, E. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethylethoxymethylenemalonate. *J. Chromatography* **1992**, *591*, 181-186.

Alcocer, M.J.C.; Arêas, J.A.G. Lipid composition and hydration characteristics of lung protein isolates defatted by several solvents. *J. Food Sci.* **1990**, *55*, 19-22.

Anderson, R.L. Effects of steaming on soybean proteins and trypsin inhibitors. *JAOC* **1992**, *69*, 1170-1176.

Arêas, J.A.G. Hydrophobic and electrostatic interactions on extrusion of protein isolates. *J. Food Sci.* **1986**, *51*, 1311-1313.

Arêas, J.A.G.; Alcocer, M.J.C.; Mota, E.M.A. Effect of organic solvent and the lipid content on functionality of bovine lung protein isolates. *Food Chem.* **1993**, *48*, 285-290.

Avancini, S.R.P.; Sales, A.M.; Aguirre, J.M.; Mantovani, D.M.B. Composição química e valor nutricional de cultivares de grão-de-bico produzidos no estado de São Paulo. *Colet. ITAL* **1992**, *22*, 145-153.

Benveniste, P. Sterol biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **1986**, *37*, 275-308.

Berger, K.U.; Barratt, M.D.; Kamat, V.B. Magnetic resonance studies on the components of human erythrocyte membranes. *Chem. Phys. Lipids* **1971**, *6*, 351-363.

Berot, S.; Davin, A. Technologie d'extraction et de purification des matières protéiques végétales. En *Protéines Végétales*. Ed. B. Godon. Technique & Documentation Lavoisier, Paris, 1996.

Beyeler, M.; Solms, J. Interaction of flavor model compounds with soy protein and bovine serum albumin. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1974**, *7*, 217-219.

Bhatty, R.S. Albumin proteins of eight edible grain legume species: electrophoretic patterns and amino acid composition. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 30, 620-622.

Boatright, W.L.; Hettiarachchy, N.S. Effect of lipids on soy protein isolate solubility. *JAOCs* **1995**, 72, 1439-1443.

Bouchez, C. *Perspectives de Développement de la Culture du Pois Chiche dans le Bassin Méditerranéen*. DAA Agronomie Méditerranéene. ENSA, Montpellier, 1985.

Bradford, M.N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.

Campbell, M.F.; Kraut, C.W.; Yackel, W.C.; Yang, H.S. Soy protein concentrate. En *New Protein Foods, Vol. V: Seed Protein Storage*. Ed. A.A. Altschul y H.L. Wilcke. Academic Press, Orlando, 1985.

Clark, P.K.; Proctor, A. Effect of equilibrium oil extraction on the chemical composition and sensory quality of soy flour and concentrates. *JAOCs* **1994**, 71, 823-826.

Cogan, U.; Yaron, A.; Berk, Z.; Mizrahi, S. Isolation of soybean protein: effect of processing conditions on yields and purity. *JAOCs* **1967**, 44, 321-324.

Créviu, I.; Bérot, S.; Guéguen, J. Large scale procedure for fractionation of albumins and globulins from pea seeds. *Nahrung* **1996**, 40, 237-244.

Cuq, J.L.; Besancon, P.; Chartier, L.; Cheftel, C. Oxidation of methionine residues of food proteins and nutritional availability of protein-bound methionine sulphoxide. *Food Chem.* **1978**, 3, 85-102.

Chapman, D. Physical studies of lipid-lipid and lipid-protein interactions. *Lipids* **1969**, 4, 251-260.

Chavan, J.K.; Kadam, S.S.; Salunkhe, D.K. Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1986**, 25, 107-158.

Cheftel, J.C.; Cuq, J.L.; Lorient, D. Nuevas fuentes proteicas. En *Proteínas Alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas*. Acribia, S.A., Zaragoza, 1989a.

Cheftel, J.C.; Cuq, J.L.; Lorient, D. Modificaciones de las proteínas. Modificaciones del valor nutricional y efectos tóxicos. En *Proteínas Alimentarias. Bioquímica. Propiedades*

funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas. Acribia, S.A., Zaragoza, 1989b.

Chen, S. Preparation of fluid soy-milk. *World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs*, Singapur. Ed. Am. Oil Chem. Soc., Illinois, 1988.

Cheryan, M. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1980**, 13, 297-335.

Chio, K.S.; Tappel, A.L. Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malondialdehyde and amino acids. *Biochem.* **1969**, 8, 2821-2827.

Davídek, J.; Jirousova, J. Formation of volatile compounds and brown products in the model system n-hexanal-glycine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1975**, 159, 153-159.

Davídek, J.; Velíšek, J.; Pokorny, J. Fats, oils, and other lipids. En *Chemical Changes During Food Processing*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990.

Dawson, R.M.C. Hydrolytic procedure for the identification and estimation of individual phospholipides in biological samples. *Biochem. J.* **1960**, 75, 45-53.

Debey, H.J.; Mackenzie, J.B.; Mackenzie, C.G. The replacement by thiazolidinecarboxylic acid of exogenous cystine and cysteine. *J. Nutr.* **1958**, 66, 607-619.

De Miguel-Gordillo, E. *El Garbanzo. Una Alternativa para el Secano*. Mundi-Prensa, Madrid, 1991.

Deshpande, S.S.; Nielsen, S.S. Nitrogenous constituents of selected grain legumes. *J. Food Sci.* **1987**, 52, 1321-1325.

Dodok, L.; Abid-Ali, M.; Hozová, B.; Halasová, G.; Polacek, I. Importance and utilization of chickpea in cereal technology. *Acta Alimentaria* **1993**, 22, 119-129.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **1956**, 28, 350-356.

Eldridge, A.C.; Black, L.T.; Wolf, W.J. Carbohydrate composition of soybean flours, protein concentrates and isolates. *J. Agric. Food Chem.* **1979**, 27, 799-802.

Esterbauer, H.; Ertl, A.; Scholz, N. The reaction of cysteine with α,β -unsaturated aldehydes. *Tetrahedron* **1976**, 32, 285-289.

FAO/WHO/UNU. Energy and protein requirements. Report of a joint meeting. WHO,

Geneva, 1985, Technical report series N° 724.

Fernández-De Tonella, M.L.; Berry, J.W. Characteristics of a chocolate beverage from germinated chickpeas. *J. Food Sci.* **1987**, 52, 726-728.

Fevrier, C.; Viroben, G. La valeur nutritionnelle des matières protéiques végétales. En *Proteines Végétales*. Ed. B. Godon. Technique & Documentation Lavoisier, Paris, 1996.

Finley, J.W. Environmental effects on protein quality. En *Chemical Changes in Food During Processing*. Ed. T. Richardson y J.W. Finley. Avi Publishing Company Inc., Connecticut, 1985.

Friedman, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *J. Agric. Food Chem.* **1996a**, 44, 6-29.

Friedman, M. Food browning and its prevention: An overview. *J. Agric. Food Chem.* **1996b**, 44, 631-653.

Fulmer, R.W. The preparation and properties of defatted soy flours and their products. *World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs*, Singapur. Ed. Am. Oil Chem. Soc, Illinois, 1988.

Fullington, J.G. Lipid-protein interaction. *Baker's Digest* **1969**, 43, 34-36.

Gardner, H.W. Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review. *J. Agric. Food Chem.* **1979**, 27, 220-229.

Gardner, H.W. Effects of lipid hydroperoxides on food components. En *Xenobiotics in Food and Feeds*. Ed. J.W. Finley y D.E. Schwass. A.C.S. Symp. Serie 234. American Chemical Society, Washington, 1983.

Gassmann, B. Preparation and application of vegetable proteins, especially proteins from sunflower seed, for human consumption. An approach. *Nahrung* **1983**, 27, 351-369.

Gatel, F. Protein quality of legume seeds for monogastrics animals. *1st European Conference on Grain Legumes*, Angers, 1992, pp 461-473.

Gattuso, A.M.; Fazio, G.; Arcoleo, G.; Cilluffo, V. Il cece. Nota I. Composizione delle farine e preparazione di derivati proteici. *Riv. Soc. It. Scienza dell'alimentazione* **1986**, 15, 451-460.

Gausserès, N.; Mahé, S.; Tomé, D. Les principales actions physiologiques des composés

associés aux protéines végétales. En *Proteines Végétales*. Ed. B. Godon. Technique & Documentation Lavoisier, Paris, 1996.

Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. *In vitro* digestibility of albumins proteins from *Phaseolus vulgaris* L. Effect of chemical modification. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 3022-3028.

Gheyasuddin, S.; Cater, C.M.; Mattil, K.F. Preparation of a colorless sunflower protein isolate. *Food Tech.* **1970**, 24, 242-243.

Ghirardi, P.; Marzo, A.; Ferrari, G. Lipid classes and total fatty acids pattern of *Cicer arietinum*. *Phytochemistry* **1974**, 13, 755-756.

Gjoen, A.U.; Njaa, L.R. Methionine sulfoxide as a source of sulfur-containing amino acids for the young rat. *Br. J. Nutr.* **1977**, 37, 93-105.

Gonçalves, N.; Vioque, J.; Clemente, A.; Sánchez-Vioque, R.; Bautista, J.; Millán, F. Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza. *Grasas y Aceites* **1997**, 48, 282-289.

Gornall, A.G.; Bardawill, C.J.; David, M.M. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem* **1949**, 177, 751-766.

Grosch, W. Reactions of hydroperoxides-products of low molecular weight. En *Autoxidation of Unsaturated Lipids*. Ed. H.W. Chan. Academic Press, London, 1987.

Guéguen, J. Relation between conformation and surface hydrofobicity of pea (*Pisum sativum* L.) globulins. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, 37, 1236-1241.

Guéguen, J.; Chevalier, M.; Barbot, J.; Schaeffer, F. Dissociation and aggregation of pea legumin induced by pH and ionic strength. *J. Sci. Food Agric.* **1988**, 44, 167-182.

Guéguen, J.; Lemarié, J.; Popineau, Y.; Denery-Papini, S.; Douillard, R.; Davin, A. Propriétés biochimiques et physicochimiques des protéines végétales. En *Proteines Végétales*. Ed. B. Godon. Technique & Documentation Lavoisier, Paris, 1996.

Gupta, N; Singh, R.S. Effect of nitrogen, phosphorus and sulphur nutrition on protein and amino acids in bengal gram (*Cicer arietinum* L.). *Indian J. Agric. Res.* **1982**, 16, 113-117.

Hamilton, R.J.; Kalu, C.; Prisk, E.; Padley, F.B.; Pierce, H. Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chem.* **1997**, 60, 193-199.

Hanafy, M.M.; Seddik, Y.; Aref, M.K. Amino acid supplementation of a protein-rich mixture of crushed groundnut, chickpea and sesame. *J. Sci. Food Agric.* **1970**, 21, 16-18.

Hatanaka, A.; Kajiwara, T.; Sekiya, J. Biosynthetic pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. *Chem. Phys. Lipids* **1987**, 44, 341-361.

Hayes, L.P.; Simms, R.P., 1973. (AE Staley MFG Co). *U.S. Patent 3734901*.

Hidalgo, F.J.; Kinsella, J.E. Changes induced in β -lactoglobulin B following interactions with linoleic acid 13-hydroperoxide. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, 37, 860-866.

Hidalgo, F.J.; Zamora, R.; Alaiz, M. Modificaciones producidas en las proteínas alimentarias por su interacción con lípidos peroxidados. II. Mecanismos conocidos de la interacción lípido (oxidado)-proteína. *Grasas y Aceites* **1992**, 43, 31-38.

Howard, P.A.; Campbell, M.F.; Zollinger, D.T., 1980. Water soluble vegetable protein aggregates. *U.S. Patent 4234620*.

Hsu, H.W.; Vavak, D.L.; Satterlee, L.D.; Miller, G.A. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.* **1977**, 42, 1269-1273.

Huang, T.C.; Chen, C.P.; Wefler, V.; Raftery, A. A stable reagent for the Liebermann-Burchard reaction. Application to rapid serum cholesterol determination, *Anal. Chem.* **1961**, 33, 1405-1407.

Jaffe, W.G. Amylase inhibitor in legume seeds. *Nutr. Rep. Int.* **1973**, 7, 169-174.

Jambunathan, R.; Singh, U. Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Int. Workshop on Chickpea*. ICRISAT, Hyderabad, 1978.

Joyard, J.; Block, M.A.; Douce, R. Molecular aspects of plastid envelope biochemistry. *Eur. J. Biochem.* **1991**, 199, 489-509.

Junta de Andalucía. *Boletín de Información Agraria y Pesquera*. Consejería de Agricultura y Pesca, 1990-1997.

Kakade, M.L.; Liener, I.E. Determination of available lysine in proteins. *Anal. Biochem.* **1969**, 27, 273-280.

Kamath, M.V.; Belavady, B. Unavailable carbohydrates of commonly consumed Indian foods. *J. Sci. Food Agric.* **1980**, 31, 194-202.

Karel, M.; Schaich, K.; Boy, R.B. Interaction of peroxidizing methyl linoleate with some proteins and amino acids. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, 23, 159-163.

Karleskind, D.; Laye, I.; Morr, C.V.; Schenz, T.W. Emulsifying properties of lipid-reduced, and calcium-reduced whey protein concentrates. *J. Food Sci.* **1996**, 61, 54-58.

Kates, M. Lipid extraction procedures. En *Techniques of Lipidology*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1986a.

Kates, M. General analytical procedures. En *Techniques of Lipidology*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1986b

Kates, M. Definition and classification of lipids. En *Techniques of Lipidology*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1986c

Kolar, C.W.; Richert, S.H.; Decker, C.D.; Steinke, F.H.; Vander Zanden, R.J. Isolated soy proteins. En *New Proteins Food*, Vol. 5. Ed. A.M. Altschul y H.L. Wilcke. Academic Press, New York, 1985.

Kozłowska, H.; Rutkowski, A; Borowski, J.; Elkowicz, K. Effects of leaching and extraction conditions on activity of trypsin inhibitor in protein concentrates and isolates obtained from soybean. *Acta Aliment. Pol.* **1977**, 3, 427-432.

Kumar, K.G.; Venkataraman, L.V. Chickpea seed proteins: Isolation and characterization of 10.3 S protein. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, 28, 524-529.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680-685.

Lamghari, R.; Villaume, C.; Pelletier, X.; Bau, H.M.; Schwertz, A.; Nicolas, J.P.; Mejean, L. Effect of rancidity of *Lupinus albus* protein-concentrate-based diets on food intake and growth of Wistar rats. *J. Sci. Food Agric.* **1997**, 75, 80-86.

Lee, S.C.; Prosky, L.; De Vries, J.W. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods-enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: Collaborative study. *Journal of AOAC International* **1992**, 75, 395-416.

Li-Chan, E.; Nakai, S.; Wood, D.F. Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. *J. Food Sci.* **1984**, 49, 345-350.

Lin, M.J.Y.; Humbert, E.S.; Sosulski, F.W. Certain functional properties of sunflower meal products. *J. Food Sci.* **1974**, 39, 368-370.

Lineback, D.R.; Ke, C.H. Starches and low molecular weight carbohydrates from chickpea and horsebean flours. *Cereal Chem.* **1975**, 52, 334-347.

Liukkonen, K.H.; Montfoort, A.; Laakso, S.V. Water-induced lipid changes in oat processing. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 126-130.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265-275.

Lynch, C.J.; Rha, C.K.; Catsimpoilas, N. Tryptic hydrolysis of glycinin and its subunits. *J. Sci. Food Agric.* **1977**, 28, 971-979.

Matoba, T.; Kurita, O.; Yonezawa, D. Changes in molecular size and chemical properties of gelatin caused by the reaction with oxidizing methyl linoleate. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, 48, 2633-2638.

McAnelly, J.K., 1964. (Swift Corporation). Method for producing a soybean product and the resulting product. *U.S. Patent 31422571*.

Meyer, E.W. Soy protein concentrates and isolates. *International Conference of Soybean Protein Foods*. United States Department of Agriculture, Agriculture and Research Service, 1967, p 142.

Millán, F. Aislados proteínicos del girasol: Estudio de los lípidos asociados y su interacción con las proteínas. *Tesis Doctoral*. Universidad de Sevilla, 1983.

Millán, F.; Vioque, E.; Maza, M.P. Study of the neutral lipids of sunflower meal and isolates. *JAOCs* **1983**, 60, 1321-1325.

Millán, F.; Vioque, E.; Maza, M.P. Polar lipids of sunflower meal and isolates. *JAOCs* **1984**, 61, 1347-1350.

Millán, F.; Alaiz, M.; Hernandez-Pinzon, I.; Sánchez, R.; Bautista, J. Study of neutral lipids of *Lupinus mutabilis* meal and isolates. *JAOCs* **1995**, 72, 467-471.

Moharran, Y.G.; Hamza, M.A.; Aman, M.B.; El-Akary, M.O. Technology and characteristics of beefburger containing plant substitutes. *Food Chem.* **1987**, 26, 189-200.

Moore, R.G.; McDermott, D.L.; Wood, T.R. Determination of chlorogenic acid in coffee. *Anal. Chem.* **1948**, 20, 620-624.

Morr, C.V.; German, B.; Kinsella, J.E.; Regenstein, J.M.; Van Buren, J.P.; Kilara, A.; Lewis, B.A.; Mangino, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *J. Food Sci.* **1985**, 50, 1715-1718.

Murray, E.D.; Myers, C.D.; Barker, L.D., 1978. Protein product and method for preparing same. *Canadian patent 262397*.

Nash, A.M.; Eldridge, A.C.; Wolf, W.J. Fractionation and characterization of alcohol extractables associated with soybean proteins. Nonprotein components. *J. Agric. Food Chem.* **1967**, 15, 102-108.

Neukom, H. Oxidative crosslinking of proteins and other biopolymers. En *Autoxidation in Food and Biological Systems*. Ed. M.G. Simic y M. Karel. Plenum Press, New York, 1980.

Nielsen, H.K.; Lölliger, J.; Hurrell, R.F. Reactions of proteins with oxidizing lipids. 1. Analytical measurements of lipid oxidation and of amino acid losses in a whey protein-methyl linolenate model system. *Br. J. Nutr.* **1985a**, 53, 61-73.

Nielsen, H.K.; Klein, A.; Hurrell, R.F. Stability of tryptophan during food processing and storage. 2. A comparison of methods used for the measurement of tryptophan losses in processed foods. *Br. J. Nutr.* **1985b**, 53, 293-300.

Pak, N.; Barja, I. Composition, content of toxic substances, protein quality and protein value of greenpeas, chickpeas and lentils grown in Chile. *Cienciae Investigacion Agraria* **1974**, 1, 105-111.

Paredes-López, O.; Ordorica-Falomir, C.; Olivares-Vázquez, M.R. Chickpea protein isolates: Physicochemical, functional and nutritional characterization. *J. Food Sci.* **1991**, 56, 726-729.

Parrado, J. Desarrollo de un proceso enzimático para el aprovechamiento proteico de la harina de girasol desengrasada. *Tesis Doctoral*. Universidad de Sevilla, 1991.

Pérez-Lanzac, J. La industria de piensos compuestos en Andalucía. Estructura de empresas y actitud ante el empleo de leguminosas-pienso y subproductos. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, 1989.

Periago, M.J.; Martínez, M.C.; Ros, G.; López, G.; Ortuño, J.; Rodrigo, J.; Rincón, F. Influencia del inhibidor de la tripsina y del ácido fítico sobre la digestibilidad in vitro de la proteína en legumbres de la dieta mediterránea. *Alimentaria* **1997**, 285, 113-117.

Piché, L.A.; Cole, P.D.; Hadley, M.; Van der Bergh, R.; Draper, H.H. Identification of N- ϵ -(2-propenal) lysine as the main form of malondialdehyde in food digesta. *Carcinogenesis* **1988**, 9, 473-477.

Plietz, P.; Damaschun, G.; Schwenke, K.D. Quaternary structure of 11S globulin from different plant seeds. *Studia Biophysica* **1980**, 79, 145-146.

Pokorny, J.; Davidek, J. Influence of interactions of proteins with oxidized lipids on nutrition and sensory value of foods. *Acta Alimentaria Polonica* **1979**, 5, 87-95.

Pokorny, J.; Davidek, J.; Chi, T.H.; Valentova, H.; Matejicek, J.; Dlaskova, Z. Reactions of oxidized lipids with protein. Part 15. Mechanism of lipoprotein formation from interactions of oxidized ethyl linoleate with egg albumin. *Nahrung* **1988**, 32, 343-350.

Pomenta, J.V.; Burns, E.E. Factors affecting chlorogenic, quinic and caffeic acid in sunflower kernels. *J. Food Sci.* **1971**, 36, 490-492.

Rao, P.U.; Belavady, B. Oligosaccharides in pulses: Varietal differences and effects of cooking and germination. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 26, 316-319.

Sair, L., 1959. (Griffith Laboratories Incorporation). Proteinaceous soy composition and method for preparing. *U.S. Patent 2881076*.

Sautier, C.; Flament, C.; Doucet, C.; Suquet, J.P. Effects of eight dietary proteins and their amino acid contents on serum, hepatic and fecal steroids in the rat. *Nutr. Rep. Internat.* **1986**, 34, 1051-1061.

Schachter, H.; Halliday, K.A.; Dixon, G.H. An alteration in the reactivity of chymotrypsin and trypsin towards hydrogen peroxide in the presence of specific substrates. *J. Biol. Chem.* **1963**, 238, PC3134-PC3136.

Sefa-Dedeh, S.; Stanley, D. Cowpea proteins. 1. Use of response surface methodology in predicting cowpea (*Vigna unguiculata*) protein extractability. *J. Agric. Food Chem.* **1979**, 27, 1238-1243.

Shenouda, S.Y.K.; Pigott, G.M. Lipid-protein interaction during aqueous extraction of fish protein: myosin-lipid interaction. *J. Food Sci.* **1974**, 39, 726-734.

Shurpalekar, K.S.; Sunderavalli, O.E.; Rao, M.N. *In vitro* and *in vivo* digestibility of legume carbohydrates. *Nutr. Rep. Int.* **1979**, 19, 111-117.

Siddiqui, S.H. A comparative study on albumins of chickpea and lentil cotyledons by chromatography on hydroxylapatite and electrophoresis in polyacrylamide gel. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* **1983**, 26, 294-296.

Singh, D.K.; Rao, A.S.; Singh, R.; Jambunathan, R. Amino acid composition of storage

proteins of a promising chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivar. *J. Sci. Food Agric.* **1988**, 43, 373-379.

Singh, H.; Privett, O.S. Studies on the glycolipids and phospholipids of immature soybeans. *Lipids* **1970**, 5, 692-697.

Singh, U. The inhibition of digestive enzymes by polyphenols of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Nutr. Rep. Int.* **1984**, 29, 745-753.

Singh, U.; Kumar, J.; Gowda, C.L.L. The protein content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by environment. *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.* **1982a**, 32, 179-184.

Singh, U.; Kherdekar, M.S.; Jambunathan, R. Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. The levels of amylase inhibitors, levels of oligosaccharides and *in vitro* starch digestibility. *J. Food Sci.* **1982b**, 47, 510-512.

Smiley, W.G.; Smith, A.K. Preparation and nitrogen content of soybean protein. *Cereal Chem.* **1946**, 23, 288.

Smith, A.K.; Johnsen, V.L.; Derges, R.E. Denaturation of soybean proteins with alcohols and with acetone. *Cereal Chem.* **1951**, 28, 325-333.

Sosulski, F.W. The Centrifuge Method for Determining Flour Absorption in Hard Red Spring Wheats. *Cereal Chem.* **1962**, 39, 344-350.

Sosulski, F.W.; Gadan, H.M. Variations in lipid composition among chickpea cultivars, *JAOC* **1988**, 65, 369-372.

Struthers, B.J.; McDonald, J.R.; Dahlgren, R.R.; Hopkins, D.T. Effects on the monkey, pig and rat pancreas of soy products with varying levels of trypsin inhibitor and comparison with the administration of cholecystokinin. *J. Nutr.* **1983**, 113, 86-97.

Sumathi, S.; Pattabiraman, T.N. Natural plant enzyme inhibitors. Part II. Protease inhibitor of seeds. *Indian J. Biochem. Biophys.* **1976**, 13, 52-56.

Sundberg, R.J. *Chemistry of Indoles*. Academic Press, New York, 1980.

Suyama, K.; Adachi, S. Reaction of alkanals and amino acids or primary amines. Synthesis of 1,2,3,5- and 1,3,4,5-substituted quaternary pyridinium salts. *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 1417-1420.

Ulloa, J.A.; Valencia, M.E.; Garcia, Z.H. Protein concentrate from chickpea: Nutritive

value of a protein concentrate from chickpea (*Cicer arietinum*) obtained by ultrafiltration and its potential use in an infant formula. *J. Food Sci.* **1988**, 53, 1396-1398.

Vairinhos, F.; Murray, D.R. Variation in the sizes of both large and small disulphide-linked subunits of legumin in representatives of *Vicieae* and *Cicer*. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* **1982a**, 107, 25-32.

Vairinhos, F.; Murray, D.R. Changes in polypeptide composition during seed development in chickpea, *Cicer arietinum* L. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* **1982b**, 106, 447-452.

Vanderkooi, G.; Organization of protein and lipid components in membranes. En *The Molecular Biology of Membranes*. Ed. S. Fleischer, Y. Hatefi, D.H. McLennan y A. Tzagoloff. Plenum Press, New York, **1977**.

Van der Maesen, L.J.G. *Cicer L., a Monograph of the Genus, with Special Reference to the Chickpea (Cicer arietinum L.), its Ecology and Cultivation*. Mededelingen Landbouwhogeschool (Communications Agricultural University), Wageningen, 1972.

Vaskovsky, V.E.; Kostetsky, E.Y. Modified spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J. Lipid Res.* **1968**, 9, 396.

Vioque, E.; Holman, R.T. Quantitative estimation of esters by thin-layer chromatography. *JAACS* **1962**, 39, 63-66.

Vioque, E.; Maza, M.P. Study of the lipids of some leguminosae. *Grasas y Aceites* **1970**, 21, 16-19.

Vioque, J.; Pastor, J.; Vioque, E. Fatty acids of leaf wax esters in *Coincya rouy* (*Brassicaceae*). *Bot. Jour. Lim. Soc.* **1995**, 118, 69-76.

Waggle, D.H.; Steinke, F.H.; Shen, J.L. Isolated soy proteins. En *Legumes. Chemistry, Technology and Human Nutrition*. Ed. R.H. Matthews. Marcel Dekker Inc., New York, 1989.

Wagner, J.R.; Añon, M.C. Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. *J. Food Sci.* **1990**, 55, 765-770.

Welch, R.W. The development of rancidity in husked and naked oats after storage under various conditions. *J. Sci. Food Agric.* **1977**, 28, 269-274.

Wolf, W.J.; Nelsen, T.C. Partial purification and characterization of the 15S globulin of soybeans, a dimer of glycinin. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 785-791.

Youngs, V.L. Oat lipids. *Cereal Chem.* **1978**, 55, 591-597.

Zamora, R.; Hidalgo, F.J.; Alaiz, M. Alteraciones bioquímicas de los lípidos en los alimentos vegetales. I. Formación de los hidroperóxidos lipídicos. *Grasas y Aceites* **1991**, 42, 155-162.

Zayas, J.F. Oil and fat binding properties of proteins. En *Functionality of Proteins in Food*. Springer, Berlin, 1997.

Zirlin, A.; Karel, M. Oxidation effects in a freeze-dried gelatin-methyl linoleate system. *J. Food Sci.* **1969**, 34, 160-164.

Paul Sanchez-Vogel
Lipidos Asociados a las Proteinas del
Gastrulo. Modificaciones de sus Proteinas
con Lipidos Oxidados. Apto "cum laude"

8

Mayo

58

~~Carie Pazmi~~

~~M. Guzman~~

~~[Signature]~~

~~[Signature]~~

llms

Paul Sanchez

x



501064388